

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Identificación y caracterización de una proteína de
unión al poli(A) de *Leishmania infantum*, LiPABP

Memoria presentada por **Natalia Guerra Pérez**

licenciada en Ciencias Biológicas,
para optar al grado de Doctor

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Servicio de Bioquímica-Investigación
del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, bajo la dirección de los Doctores **María
Elena Martín Palma** y **Víctor Manuel González Muñoz**

MADRID, 2010



Hospital Universitario
Ramón y Cajal
Comunidad de Madrid



Dña. María Elena Martín Palma y Don Víctor Manuel González Muñoz,
Investigadores de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital
Universitario Ramón y Cajal (FIBio-HRC) en el Servicio de Bioquímica del
Departamento de Investigación del Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria
(IRyCIS)

INFORMAN:

Que el trabajo "**Identificación y caracterización de una proteína de unión al poli(A) de *Leishmania infantum*, LiPABP**", ha sido realizado por Doña Natalia Guerra Pérez en el Servicio de Bioquímica del Departamento de Investigación del Hospital Universitario Ramón y Cajal, bajo su dirección y cumple con todos los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral.

Madrid a 25 de Mayo del 2010

Fdo.: Dra. María Elena Martín

Fdo: Dr. Víctor Manuel González

Fdo: Dr. José María Requena Rolanía
(Profesor Titular del Dto. De Biología Molecular y tutor de tesis)



A mi abuela, madre y hermana,
las tres *Gracias* que me cuidan

AGRADECIMIENTOS

Érase una vez una niña, a la que se le daban bien los problemas de genética....

No fue la genética la que me enganchó al final a la ciencia, ni la inmunología ni la bioquímica, materias que he disfrutado en este camino, sino el deseo de preguntarme cada día una cosa más. El porqué de las cosas que decía Quim Monzón, se ha convertido en mi profesión, y para todos aquellos que han compartido mi vida, me gustaría agradecerlos todo lo que habéis aportado a la persona que soy.

Agradecer en primer lugar a las personas que me han guiado en este trabajo, el Dr. Víctor Manuel González y la Dra. María Elena Martín, mis directores de Tesis. Vosotros habéis conseguido que una inmunóloga inexperta, tarea en momentos difíciles, se ilusione en el mundo de la investigación. Gracias por enseñarme el camino, y mostrarme el lado sorprendente de la ciencia.

Al Dr. Alberto Alcazar, por sus infinitas conversaciones de ciencia, del mundo en general y nuestro en particular. Gracias por ayudarme siempre que te lo he pedido. Y por supuesto a la Dra. Matilde Salinas, entrañable en el laboratorio, gran persona y profesional. Gracias por valorarme, tengo mucho que aprender de ti, no te olvidaré.

Al Dr. Manuel Soto, gracias por pasarme los bichitos, por la paciencia y apoyo durante toda esta tesis.

A Edurne, amiga y compañera, lo mejor que puedo sacar de esta experiencia es haberte conocido. Gracias por las risas, por la confianza y por el apoyo incondicional, hemos crecido juntas en el laboratorio y lo seguiremos haciendo. Ya sabes que la mitad de esta tesis te la debo a ti, gracias y besos infinitos. Jessica, gracias a ti también por venir con ese aire *romántico* y feliz cada día, no dejes que nadie apague ese duende que tienes.

Agradezco también a todas las personas del laboratorio de Bioquímica, Eva, Macarena e Irene, sin vosotras esto no hubiera sido lo mismo. Y en especial a Merche y Maribel, por su buen hacer técnico en estos últimos momentos. Gracias a Bea, Elisa, María y

Dani, mi hermano mayor de *Leishmania*, habéis estado poco tiempo por aquí, pero dejáis vuestro buen humor, si me necesitáis sólo tenéis que silbar. Y por supuesto no me olvido de los que ya no están y que dejaron huella, Lidia, Raul y en especial de David, que aunque ya no estás, estás, y siempre estarás, un beso enorme.

Como dicen que soy una persona sociable, me llevo mucho cariño de todas las personas que están en el departamento. Gracias por pararos en mi puerta y sacarme una sonrisa, por un ¿te puedo ayudar?, por escuchar, por seguir mis locuras, por hinchar globos, por dejarme anticuerpos, celulitas,...por compartir el día a día, sois parte de esto. Gracias *superchicas del array*, Lorena, Verónica e Irene, por ser tan espontáneas y divertidas, os voy a echar de menos. Gracias a Gema, Paquita, Gely, chicas del *Lipoclub*, María Emilia, María Eugenia, Paloma por compartir torrijas, microondas, *pasilleo*, agobios y sacarlos adelante, y por supuesto a Cova y Lidia, que en estos últimos meses de confianzas no se que hubiera hecho sin vosotras. Gracias a Alberto, por llegar con aire fresco “sevillano”, que pena que ya me vaya, eres un tipo especial. Y muchísimas gracias a Jana y a Rebeca, por el equilibrio, humanidad y sencillez, ay¡¡ Rebeca que siempre estás para todas mis dudas¡¡. Me encanta haberos conocido, espero que nos volvamos a encontrar y que siga aprendiendo de vosotras.

Gracias a la parte electrofisiológica, Lula e Itziar, por esas tardes solitarias que se animan si vuestra puerta está abierta. Y a los *marimenos*, Juan, Ana, Laura, Carolina e Izaskun, que siempre tenéis una sonrisita o una palabra de apoyo. Y en general a todos los del pasillo de Neuro, Macarena, Cris, Rafa, Jota y Tony, que siempre me recibís bien cuando voy a pedir algo, ya sea una duda informática, un cargador de móvil o un destornillador..., y a Nuria, Ana, y Maribel, que aunque ya no estáis, hemos compartido mucho. No me puedo olvidar de Silvi, dispuesta siempre a ayudarte en todo¡ te llevo conmigo y seguiremos en contacto, un besazo a mi hada especial. Y a Cruz y a Merche de inmuno, por mostrarme lo buenas personas que sois. Y gracias a Eli, Nacho, Elia, David y Laura, creo que os han puesto el laboratorio en el peor lugar del hospital para compensar. Hay tanto bueno en vosotros que espero se me haya pegado algo. Os quiero, por las risas, por las cervecitas, por ese hombro en el que

apoyarme, y por supuesto esto no es un fin, es un *to be continued*. Y por extensión, gracias Mónica por ayudarme en Washington, compartir confidencias, cervecitas, sushi y alitas explosivas... ya sabes que para mi eres más especial que Obama.

Gracias a Isabel, mi *murcianica* querida, ya sabes que eres lo mejor de la huerta y me llevo tu amistad donde quiera que vaya. Y no me olvido de mis compis del Hospital Virgen de la Arrixaca, técnicos, Olga, María, Luis, Rosa, Gema, Jorge, M^a Victoria, Vicky, Rocío y Jose Antonio. La residencia la superé con creces gracias a vosotros. Y a Luis, Rubén y Jota, que hicisteis que la palabra amistad, diversión y apoyo fueran en el mismo camino.

Y a los amigos no-científicos, Gema, Germán, Eugenio, Zaida, Verdu, Pepa, Víctor, Mila, Mari, Julian, Virginia, Jorge y Fidel, gracias por apoyarme siempre, por quererme como soy, escuchar mis batallitas y sacar el lado divertido. Gracias a Irene, Dani, Araceli, Miguel, Andrés, Mencha e Inés, por esos momentos de cocido a las cinco de la tarde, cervezas malasañeras y Valdemorillos nocturnos. Y en especial a David, amigo y hermano, por ser mi lucecita y mi apoyo del alma. Y a las amigas de siempre, Pepa y Eva, a vosotras si que os he dado trabajo. El día que nos pongamos a escribir historietas, Almodovar nos compra los derechos. Gracias por no dejarme ir a *Broadway*, por esas noches de campamentos-granja, estrella va, viento viene, por el *iluminada y eterna...* Espero seguir siempre de vuestra mano. Paco gracias por tus consejos *pretésicos*.

Y a Jose, que apareciste sin avisar y te has quedado para hacerte hueco en mi vida.

Y a mi madre y a mi hermana, no podemos estar más orgullosas de todo lo que hemos construido juntas. Esta tesis y toda mi vida es para vosotras.

Y gracias a Gene Kelly, Bette Davis, Gregory Peck, Humphrey Bogart, Audrey Hepburn, Joaquín Sabina, Silvio Rodríguez, Presuntos implicados, *The Band*, *The Carpenter*, *Suede*, Alaska y Abba... el cine y la banda sonora de mi vida que siempre me acompaña...

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en muchos países causada por parásitos del género *Leishmania*. En España la especie predominante es *L. infantum*, cuya infección produce afecciones viscerales. Uno de los procesos menos conocidos en la biología del parásito es la traducción. La proteína de unión a poli(A), PABP en eucariotas, está implicada en este proceso, favoreciendo la circularización del ARNm, y en la biogénesis y estabilidad de ciertos mensajeros. El descubrimiento de los aptámeros en 1990 produjo un importante interés académico e industrial debido a que estas moléculas podían convertirse en potenciales herramientas terapéuticas y diagnósticas gracias a la especificidad del reconocimiento molecular y a la facilidad con la que son seleccionadas, aisladas y modificadas. Los aptámeros, seleccionados mediante un proceso denominado SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), son moléculas de ARN o ADNmc capaces de reconocer con alta afinidad y de forma específica una molécula diana debido a la estructura tridimensional que son capaces de adoptar dependiendo de su secuencia.

En este contexto, hemos caracterizado estructural y funcionalmente la proteína homóloga de unión a poli(A) en *L. infantum*, LiPABP. Esta proteína está muy conservada en la evolución y se caracteriza por unir secuencias de adeninas. LiPABP contiene, al igual que otras PABPs descritas en eucariotas, la secuencia, localización y estructura terciaria de los principales dominios de unión a ARN (RRM) y del dominio de interacción con proteínas (PABC). A su vez, hemos obtenido y caracterizado una población de aptámeros de ADNmc frente a LiPABP, y, a partir de dicha población, hemos obtenido aptámeros individuales que son capaces de detectar concentraciones mínimas de proteína en rango nM. Además, se describe la capacidad del aptámero de purificar específicamente LiPABP presente en homogeneizados celulares mediante un sistema de cromatografía desarrollado con estas moléculas.

En definitiva, aptámeros seleccionados frente a distintas proteínas del parásito podrían ser utilizados en sistemas de diagnóstico de la leishmaniasis y/o como potenciales herramientas terapéuticas frente a la enfermedad, así como herramientas biotecnológicas.

Leishmaniasis is endemic in many countries caused by parasites of the genus *Leishmania*. In Spain the main species is *L. infantum*, which causes visceral disease infection. One of the lesser-known processes in the biology of the parasite is the translation. The poly(A) binding protein, PABP in eukaryotes, is involved in translation, promoting mRNA circularization, and in the biogenesis and stability of certain messengers. The discovery of aptamers in 1990 had a significant academic and industrial interest since these molecules could become potential therapeutic and diagnostic tools because of the specificity of molecular recognition and the simplicity with which they are selected, isolated and modified. The aptamers, selected through a process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), RNA or ssDNA molecules are being able to recognize with high affinity and specifically a target molecule due to three-dimensional structure that are able to take depending on the sequence.

In this context, we have characterized structurally and functionally homologous poly (A) binding protein in *L. infantum*, LiPABP. This protein, conserved in evolution, binds sequences of adenine and shares, as described in other eukaryotes, the localization sequence and tertiary structure of the main RNA binding domains (RRM) and the protein interaction domain (PABC). In addition, we obtained and characterized a ssDNA aptamer population against LiPABP, and from the selection, we have characterized individual aptamers that are able to detect minimal concentration of protein in nM range. The ability of the aptamer to purify LiPABP specifically from cell homogenates was observed in a chromatography system developed with these molecules.

In short, aptamers selected against different parasite proteins could be used in diagnostic systems for leishmaniasis and / or as potential therapeutic tools against the disease, as well as biotechnological tools.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IV
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. LEISHMANIASIS	9
1.1. Manifestaciones clínicas	10
1.2. Tratamiento y vacunas	11
2. EL PARÁSITO PROTOZOO <i>Leishmania</i>	13
2.1. Ciclo biológico	14
2.2. Biología molecular del parásito <i>Leishmania</i>	15
3. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUCARIOTAS	18
3.1. Etapa de iniciación	18
3.2. Etapa de elongación y terminación	20
4. LA PROTEÍNA PABP	21
5. APTÁMEROS	25
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. MATERIAL	35
1.1. Líneas celulares	35
1.2. Medios de cultivo	35
1.3. Tampones y soluciones	37
1.4. Material para biología molecular	39
1.5. Material para el estudio y análisis de proteínas	41
1.6. Instrumentación	43
2. MÉTODOS	44
2.1. Cultivo y manipulación de células	44
2.1.1. Parásitos	44
2.1.2. Bacterias	45
2.1.3. Líneas celulares eucariotas	45

2.2. Técnicas de biología molecular	47
2.2.1. Análisis de secuencias	47
2.2.2. Extracción de ADN	48
2.2.3. Procesamiento y manipulación del ADN aislado	49
2.2.4. Electroforesis de ADN	50
2.2.5. Diseño de construcciones plasmídicas	51
2.3. Técnicas de separación y análisis de proteínas	53
2.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE	53
2.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes	53
2.3.3. Transferencia de proteínas a membrana y detección	53
2.3.4. Expresión y purificación de PABP recombinante	54
2.3.5. Purificación de la proteína recombinante	55
2.4. Ensayos de caracterización de proteína	57
2.4.1. Cromatografía de afinidad en suspensión	57
2.4.2. Ensayos de fosforilación	58
2.4.3. Valoración de la antigenicidad mediante inmunoensayo E.L.I.S.A	59
2.5. Proceso SELEX	59
2.5.1. Selección <i>in Vitro</i>	59
2.5.2. Clonaje de los aptámeros	61
2.5.3. Transferencia de proteínas por difusión Slot Blot	61
2.5.4. Detección con aptámeros	62
2.5.5. Inmunoensayo enzimático en placa con aptámeros	62
2.5.6. Purificación con aptámeros	63
2.6. Análisis estadístico	64
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN AL POLI (A) DE <i>L. infantum</i> , LiPABP	67
1.1. Historia evolutiva e identificación de dominios conservados de la proteína LiPABP	67
1.2. LiPABP conserva los mismos dominios que PABPs de otros organismos	69

1.3. LiPABP tiene la misma estructura tridimensional que las proteínas PABPs de otros eucariotas	72
2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LiPABP	75
2.1. Expresión heteróloga de LiPABP en células de mamíferos	75
2.2. LiPABP es sustrato de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 MAPK	79
2.3. LiPABP se une a secuencias de adeninas	82
3. RECONOCIMIENTO DE LiPABP POR SUEROS DE PERROS INFECTADOS CON <i>L. infantum</i>	84
3.1. Antigenicidad de LiPABP	84
3.2. LiPABP une específicamente secuencias de adenina en <i>L. infantum</i>	89
4. SELECCIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS FRENTE A LiPABP	90
4.1. Selección de aptámeros que interaccionan con la proteína LiPABP	90
4.2. Límites de detección de la población SELLiPABP por la proteína LiPABP	91
4.3. Especificidad de la unión de SELLiPABP	94
4.4. Identificación, clonaje y caracterización de aptámeros individuales	95
4.5. Análisis de afinidad y secuencia-estructura de los aptámeros de alta afinidad	99
4.6. Análisis de afinidad del clon SEL4LiPABP#7	101
4.7. Estudio de afinidad del clon SEL4LiPABP#7. Aptapurificación	104
CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	111

Figura 1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> .	11
Figura 2. Ciclo biológico del género <i>Leishmania</i> .	14
Figura 3. Iniciación de la traducción.	20
Figura 4. Interacciones de PABP con proteínas implicadas en traducción.	23
Figura 5. Metodología SELEX.	26
Figura 6. Programa de PCR de amplificación de insertos.	49
Figura 7. Clonaje de la secuencia desde promastigotes de <i>L. infantum</i> .	51
Figura 8. Subclonaje en los vectores pQe30 y pcDNA3.	52
Figura 9. Muestras obtenidas en el proceso de purificación de la proteína LiPABP.	57
Figura 10. Programa de PCR de amplificación de aptámeros.	60
Figura 11. Relaciones evolutivas de las proteínas de unión a poli(A) (PABPs).	69
Figura 12. Alineamiento de LiPABP con PABPs homólogas representativas de tripanosomátidos y eucariotas superiores.	70
Figura 13. Mapa de dominios de LiPABP y otras PABPs.	72
Figura 14. Modelización de la estructura en 3 dimensiones de LiPABP.	74
Figura 15. Expresión en una línea celular eucariota de LiPABP de <i>L. infantum</i> .	75
Figura 16. Expresión de LiPABP de <i>L. infantum</i> en diferentes líneas celulares eucariotas.	76
Figura 17. Expresión de LiPABP en un sistema <i>in vitro</i> .	76
Figura 18. Fosforilación de LiPABP.	80
Figura 19. Determinación de posibles motivos funcionales.	81
Figura 20. Capacidad de unión de las proteínas PABP y LiPABP a una cadena de nucleótidos de adenina.	83
Figura 21. Análisis de la reactividad IgG frente a LiPABP.	85
Figura 22. Análisis de la especificidad del suero policlonal de perros con LV canina.	86
Figura 23. Detección de LiPABP endógena.	87
Figura 24. Curva de concentración de LiPABP.	88
Figura 25. Capacidad de unión de la proteína LiPABP endógena a una cadena de nucleótidos de adenina.	89

Figura 26. Diferencias en la capacidad de unión a LiPABP de la población de aptámeros SELLiPABP y la población inicial RND40.	91
Figura 27. Reconocimiento dependiente de concentración de la población SELLiPABP.	92
Figura 28. Valoración de la capacidad de unión por Slot Blot de SELLiPABP.	93
Figura 29. Especificidad de la población SELLiPABP.	94
Figura 30. Capacidad de unión de la población inicial, SEL3LiPABP, SEL4LiPABP y clones obtenidos a partir de las poblaciones seleccionadas.	97
Figura 31. Porcentaje de bases GC de los aptámeros con afinidad por LiPABP.	99
Figura 32. Análisis de la interacción a la proteína LiPABP de los aptámeros #3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3.	100
Figura 33. Estructuras secundarias teóricas de los aptámeros 3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3.	100
Figura 34. Comparativa de la interacción con la proteína diana del clon #7.Rda4-F3 y de la población inicial RND40.	102
Figura 35. Límites en la capacidad de unión del clon SEL4LiPABP#7.	103
Figura 36. Límites de reconocimiento por Slot Blot del aptámero SEL4LiPABP#7 sobre la proteína LiPABP.	104
Figura 37. Especificidad del aptámero SEL4LiPABP#7.	105
Tabla 1. Composición de tampones y soluciones generales.	37
Tabla 2. Cebadores para la secuenciación de insertos y su amplificación por PCR	40
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos de más de 50 pb.	40
Tabla 4. Anticuerpos primarios.	42
Tabla 5. Anticuerpos secundarios.	42
Tabla 6. Proteínas PABPs homólogas.	48
Tabla 7. Tampones utilizados en la purificación de la proteína recombinante.	56
Tabla 8. Tampones utilizados en la unión a poli(A)-sefarosa.	58
Tabla 9. Proteínas de unión a poli(A) de diferentes organismos.	68
Tabla 10. Grupos de afinidad de los aptámeros de SEL3LiPABP y SEL4LiPABP.	98

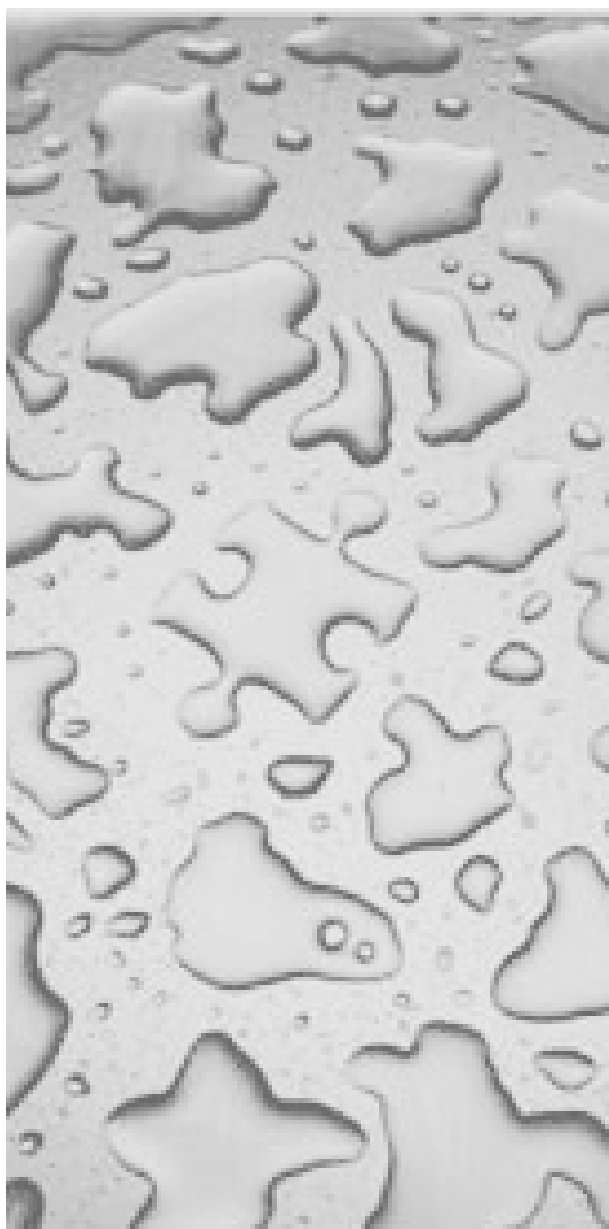
ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN_{mc}	ADN monocatenario
ADN_c	ADN complementario
Amp	Ampicilina
ARE	Secuencia rica en AU (<i>AU-Rich Element</i>)
AREBP	Proteína de unión a elementos ARE
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_r	ARN ribosómico
ARN_m	ARN mensajero
ARN_t	ARN transferente
ARN_t^{Met}	Metionil-ARN _t -iniciador
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
cap	Ácido 7-metilguanílico en el extremo 5' del ARN _m
col	Colaboradores
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Medio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eEF	Factor de elongación eucariota
EGTA	Ácido etilenoglicolitetracético
eIF	Factor de iniciación eucariota
eRF	Factor de terminación eucariota
G	Guanina
GDP	Guanosina 5' difosfato
gp	Glicoproteína

GTP	Guanosina 5' trifosfato
HEK	<i>Human Embryo Kidney cells</i> (células humanas embrionarias de riñón)
HepG2	<i>Human hepatocellular liver carcinoma cell line</i> (células humanas de carcinoma hepatocelular)
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear
HRP	Peroxidasa del rábano picante
hsp	Proteína de choque térmico
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalacto-piranósido
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
LC	Leishmaniasis Cutánea
LCD	Leishmaniasis Cutánea Difusa
LDPK	Leishmaniasis Dérmica Post Kala-azar
LMC	Leishmaniasis Mucocutánea
LV	Leishmaniasis Visceral
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
Mb	Megabase
MCF7	Línea celular del <i>Michigan Cancer Foundation</i>
N-terminal	Extremo amino terminal
OMS	Organización Mundial de la Salud
PABP	Proteína de unión a cola poli(A) de los ARNm
PAIP1	Proteína 1 de interacción con PABP (<i>Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1</i>)
PAIP2	Proteína 2 de interacción con PABP (<i>Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2</i>)
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Poli(A)	Secuencia de adeninas
S	Unidad de sedimentación o Svedberg
SELEX	Enriquecimiento exponencial por sistemática evolución de ligandos
S.E.M	Error estándar de la media
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
snRNP	Ribonucleoproteína pequeña nuclear
Sxl	Proteína <i>sex-lethal</i> en <i>Drosophila</i>
T	Timina
Th	Linfocitos T colaboradores o <i>helper</i>
U	Uracilo
UI-70K	Ribonucleoproteína pequeña nuclear de 70 kDa
uv	Ultravioleta
UTR	Región no codificante del ARNm
VHA	Virus de la hepatitis A
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Los términos que no presentan una clara traducción al español están escritos en cursiva a lo largo del texto.



I. INTRODUCCIÓN

*El arte de la ciencia:
repasar el camino,
mirar lo que otros miraron
y ver lo que otros no vieron*
Ralph Waldo Emerson

1. LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es un grupo de **enfermedades parasitarias**, transmitida por vectores y producida por protozoos del género *Leishmania*. Está ampliamente distribuida en 22 países en el Nuevo Mundo y en 66 del Viejo Mundo, y es endémica en zonas tropicales, subtropicales y del sur de Europa. Se considera que existen 12 millones de personas afectadas en todo el mundo, y que 367 millones de personas están en situación de riesgo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se producen cada año 2 millones de casos nuevos, de los cuales 1,5 millones sufren Leishmaniasis Cutánea (LC) y 500.000 padecen Leishmaniasis Visceral (LV) (www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis).

El **vector** responsable de la transmisión por picadura es la mosca de los arenales, del género *Phlebotomus* en el Nuevo Mundo y del género *Lutzomyia* en el Viejo Mundo (Bates, 2007), dípteros que pertenecen a la familia *Psychodidae*. De esta familia sólo un 10% de las aproximadamente 700 especies que se conocen, se comportan como vectores, y sólo 30 de éstas son importantes en la transmisión de la leishmaniasis (Lane, 1991; Cox, 2002; Sharma y Singh, 2008). En España, las especies de flebotomos responsables son *P. perniciosus* y en menor medida *P. ariasi* (Gálvez y col., 2010a; Aransay y col., 2004; Feliciangeli, 2004). El vector se desarrolla en regiones húmedas y cálidas, ricas en materia orgánica y sólo la hembra es hematófaga, con mayor predilección por el perro que por el hombre lo que convierte al perro en el principal reservorio en esta zona geográfica. La presencia de *L. infantum* se ha descrito en nuestro país en otros vertebrados domésticos, como gatos (Ayllón y col., 2008; Tabar y col., 2008), y no domésticos como lo son lobos (Sastre y col., 2008), zorros, ginetas, mangostas y lince (Sobrino y col., 2008), sugiriendo un ciclo salvaje en la transmisión de la leishmaniasis. Estudios en caballos, donde se observa reactividad del suero frente a *L. infantum* en animales sanos, indican que la respuesta inmune de estas especies es efectiva en controlar la infección (Fernández-Bellón y col., 2006). Debido a la detección de nuevos reservorios en determinados ambientes, se realizan estudios geográficos en el marco del Proyecto Integrado de la Comisión Europea de Enfermedades Emergentes (EDEN), cuyo objetivo es identificar y catalogar los ecosistemas europeos y las

condiciones ambientales que determinan la distribución y la dinámica de diversos agentes patógenos como *L. infantum* (Gálvez y col., 2010b).

En nuestro país es una **enfermedad de declaración obligatoria**, con una tasa de incidencia de 0,40 por 100.000 habitantes/año (Morillas y col., 1996; Valcárcel y col., 2008). Un 83,6% de los pacientes presenta la forma visceral y un 42% de los ingresos hospitalarios corresponden a pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que indica que en España el mayor grupo de riesgo son los adultos adictos a drogas por vía intravenosa (Desjeux y Alvar, 2003) y que comparten jeringuillas contaminadas (Cruz y col., 2002; Pineda y col., 2002). Así, independiente del vector, se establece un ciclo artificial en la transmisión de leishmaniasis.

1.1. Manifestaciones clínicas

El progreso de una infección no sólo depende de las especies que determinan la enfermedad (Figura 1), sino también del estado inmunológico del huésped y su capacidad para influir en el avance de la leishmaniasis. Está descrito que en algunos casos puede existir una predisposición genética a desarrollar la enfermedad (Alexander y col., 1999). Existen varias manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, siendo la forma más común y la menos grave la **Leishmaniasis Cutánea** (LC) o Botón de Oriente, pápula en el lugar de la picadura del vector, normalmente en extremidades, mejillas y orejas. Esta lesión, que aumenta de tamaño, cura espontáneamente en un proceso lento de entre 3 y 18 meses (Davidson, 2004). Una variante de esta forma en el Nuevo Mundo es la **Leishmaniasis Cutánea Difusa** (LCD), caracterizada por lesiones diseminadas, similares a las producidas por la lepra. Cuando la destrucción de tejidos se propaga por el labio superior y nariz, llegando incluso a la nasofaringe y vías respiratorias superiores, es denominada **Leishmaniasis Mucocutánea** (LMC) o espundia, que en algunos casos esta asociada a una LC previa (Piscopo y Mallia Azzopardi, 2007). Estas ulceraciones desfiguran el rostro y, aunque la mortalidad es baja, infecciones secundarias o malnutrición pueden causar la muerte. En el caso de la **Leishmaniasis Visceral** (LV) o *Kala-azar* los amastigotes que se diseminan a través del

sistema retículoendotelial llegan al hígado y al bazo, produciendo fiebre y debilidad, pérdida de peso, dolor abdominal causado por el aumento de tamaño del hígado y bazo inflamados, pancitopenia e hipergammaglobulinemia (Herwaldt, 1999). Aunque la mayoría de las infecciones viscerales son asintomáticas en individuos inmunocompetentes, por ejemplo en España la proporción de infecciones asintomáticas y casos clínicos es 50:1 (Moral y col., 2002), ésta es la forma más grave de la enfermedad y los pacientes que la sufren mueren después de semanas o meses si no reciben tratamiento. Una variante de la LV causada por *L. donovani*, pero no por *L. chagasi* o *L. infantum* (Zijlstra y el-Hassan, 2001), es la **Leishmaniasis Dérmica Post-Kala-azar** (LDPK), que se produce meses o años después de la LV, y presenta manchas hipopigmentadas o nódulos oscuros en la cara, parte superior del pecho y en las manos (Davidson, 2004).

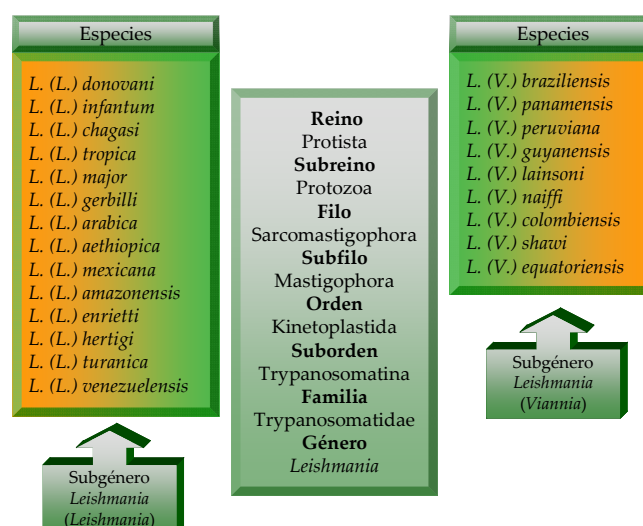


Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania*.

1.2. Tratamiento y vacunas

Actualmente los fármacos usados en el tratamiento de la leishmaniasis presentan problemas graves que incluyen una alta toxicidad y la aparición de cepas resistentes (Sundar y col., 2001). La primera línea de actuación para el tratamiento de LV la constituyen los antimoniales pentavalentes (Pentostam®; Glucantime®), que actúan inhibiendo el catabolismo del parásito. El análogo de lipofosfolípidos Miltefosina (Impavido®) es utilizado como agente antitumoral y es el primer fármaco eficaz activo por vía oral indicado para LV y LC en algunos países (Sundar y Rai, 2002; Soto y Toledo, 2007). Este compuesto es teratogénico y los pacientes suelen presentar náuseas,

vómitos, diarreas y alteraciones renales (Davidson, 2004). Para aquellos individuos que presentan resistencia a antimoniales se han utilizado diversos fármacos como la Pentamidina para casos con LC y LMC (Nacher y col., 2001), y la Anfotericina B, antibiótico con propiedades anti-fúngicas, que también presenta efectos secundarios importantes, muy eficaz para cepas resistentes a antimoniales por su capacidad de interaccionar con la membrana del parásito. Existen nuevas formulaciones (Ambisome®) donde la Anfotericina B está encapsulada en liposomas, disminuyendo la toxicidad y aumentando así la concentración en los tejidos. Lamentablemente presenta un elevado coste de producción que no es asequible para la mayoría de países subdesarrollados afectados. En la última década, tratamientos combinados de quimioterapia e inmunoterapia se utilizan para acelerar la respuesta inmune específica de los pacientes, induciendo la respuesta Th1 (revisado por (El-On, 2009)).

Hasta el momento no se ha obtenido una **vacuna** eficaz para la enfermedad, aunque existen multitud de aproximaciones que se centran en proteínas recombinantes, secuencias de ADN, y en células dendríticas cargadas con péptidos derivados de antígenos. Las dianas elegidas se conservan entre las especies de *Leishmania*, y algunas son específicas de amastigote, como la esterol metiltransferasa (SMT) de *L. infantum*, implicada en la biosíntesis de ergosterol que confiere resistencia a LV en un modelo animal cuando va asociada con un adyuvante (Goto y col., 2009). Otras dianas pertenecen a familias muy conservadas como las histonas (Probst y col., 2001; de Carvalho y col., 2003), la proteína ribosomal ácida LiP2a (Soto y col., 2000), la proteína inducible por estrés LmSTI1 y LACK, receptor para la quinasa C activada (Meddeb-Garnaoui y col., 2010; Julia y col., 1996; Requena y col., 2000; Melby y col., 2001). Aunque varios candidatos actuales presentan elevada antigenicidad, la protección de estos antígenos ha fracasado en más de un modelo animal (Sjolander y col., 1998). Otra perspectiva de estudio es el uso de poliepítopos, constituidos por múltiples determinantes antigénicos que en algunos casos presentan mejor protección que dianas individuales (Xu y Liew, 1995; Gurunathan y col., 1997; Rafati y col., 2001). Se han descrito combinaciones de secuencias de ADN inmunogénicas universales para linfocitos Th, asociadas con secuencias codificantes para gp63 y hsp70 de *Leishmania*

(Sachdeva y col., 2009), para LmSTII1, que protegen en ratones de la infección de *L. major* (Campos-Neto y col., 2002), y secuencias de cisteína-proteasas de *L. infantum* estudiadas en LV (Rafati y col., 2005; Khoshgoo y col., 2008). Por otro lado, las células dendríticas son determinantes en la protección y reducen la concentración de amastigotes en el hígado y bazo de ratones infectados. La introducción mediante pulsos de histonas nucleares de *L. infantum* en estas células confiere protección frente a LC en ratones (Carrión y col., 2007). Otras líneas de investigación analizan parásitos atenuados, modificados genéticamente en secuencias codificantes de proteínas implicadas en la multiplicación del parásito. En este contexto una cepa de *L. infantum* deficiente en uno de los genes para hsp70, resulta menos virulenta y protege a animales de experimentación del desarrollo de la leishmaniasis (Folgueira y col., 2005; Folgueira y col., 2008).

2. EL PARÁSITO PROTOZOO *Leishmania*

Desde que en los años 1900 el profesor Charles Donovan y el Dr. Leishman, de forma independiente, observaran cuerpos ovales intracitoplasmáticos en pacientes con LV, y éstos fueran identificados como protozoos parásitos intracelulares (cuerpos Leishman-donovani) del género *Leishmania*, se han descrito más de 20 especies, similares en cuanto a su morfología, pero con importantes diferencias bioquímicas y moleculares. Un total de 21 especies de *Leishmania* han sido identificadas como patógenos para humanos (Figura 1) y en 1990 Rioux y colaboradores determinaron la actual clasificación taxonómica del género, mediante la electroforesis de isoenzimas, denominando *zimodema* a cada perfil obtenido (Rioux y col., 1990). Actualmente se han identificado nuevos biomarcadores que definen especies y se han propuesto variaciones a esta clasificación basadas en análisis genéticos que incluyen estudios de secuencias de ADN de genes codificantes, microsatélites y polimorfismos de fragmentos de restricción (Mendoza-León y col., 2002; Lukes y col., 2007; Smith y col., 2007). En nuestro país, mediante análisis de microsatélites, se han identificado 22 *zimodemas* de los 33 descritos en todo el mundo, de los cuales 12 han sido citados únicamente en España (Bulle y col., 2002).

2.1. Ciclo biológico

El parásito *Leishmania* presenta un **ciclo digenético**, con dos estados diferentes en su ciclo de vida: la forma flagelar promastigote extracelular, en el intestino del vector, y la forma amastigote carente de flagelo, en el interior de células fagocíticas del hospedador vertebrado (Figura 2).

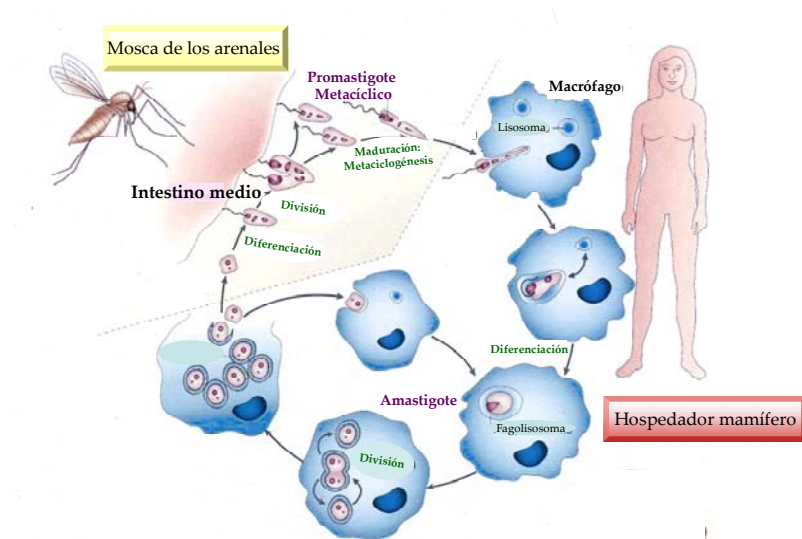


Figura 2. Ciclo biológico del parásito *Leishmania*. Representación de los dos estadios de vida del parásito en el vector y en el hospedador (modificado de (Sacks y Noben-Trauth, 2002)).

La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo por la picadura de la mosca hembra hematófaga, mientras se alimenta de sangre en un hospedador infectado. Los promastigotes en el intestino del vector se denominan procíclicos (Sacks, 1989) y se mantienen durante 7-15 días en el intestino medio donde se multiplican por fisión binaria. Estas formas desarrollan cambios en su actividad y replicación, en un proceso denominado metaciclogénesis, convirtiéndose en promastigotes infectantes o metacíclicos no replicativos, que ascienden a la probóscide de la mosca. Cuando este vector pica a otro hospedador transfiere mediante la saliva las formas metacíclicas en la dermis del nuevo organismo. En el nuevo hospedador, los parásitos son internalizados mediante fagocitosis (12-24 horas después de la inoculación) y se mantienen dentro de macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (Peters y Sacks, 2009), en la llamada vacuola parasitófora o fagolisosoma (Chang, 1983). Las nuevas condiciones de temperatura y acidez (37°C y pH ácido) promueven la transformación en amastigotes con la consiguiente pérdida del flagelo (Antoine y col., 1998). En este estado se dividen

dentro de la vacuola parasitófora (Chang, 1983), antes de la ruptura de la célula huésped. Los parásitos liberados son internalizados entonces por nuevos macrófagos, lo que contribuye a su diseminación por el sistema vascular en el organismo huésped. Los fagocitos circulantes infectados, que son adquiridos por la picadura de un nuevo vector, se desintegran en la probóscide del flebotomo debido al descenso de temperatura (26°C) y a la alcalinización del medio. Es entonces cuando los amastigotes comienzan su transformación en la forma flagelar en el tracto digestivo.

2.2. Biología molecular del parásito *Leishmania*

La divergencia de los tripanosomátidos, familia a la que pertenece el género *Leishmania*, se produce en etapas tempranas del proceso evolutivo de los eucariotas. Análisis filogenéticos de diferentes organelas y proteínas metabólicas documentan que esta separación es posterior a la adquisición de la organización de la mitocondria (Hannaert y col., 2003), pero anterior de la disociación de las levaduras (Sogin y col., 1989). Esta situación evolutiva confiere a *Leishmania*, al igual que otras especies de la familia, ciertas peculiaridades moleculares que la diferencian del resto de organismos eucariotas.

El ADN está organizado en dos unidades independientes, el genoma nuclear y el genoma mitocondrial en el kinetoplasto, que está compuesto por maxicírculos y minicírculos y codifica para ARNs y proteínas ribosomales. El genoma nuclear de *Leishmania* es **diploide** y, aunque de forma general se reproduce de forma asexual por fisión binaria, datos recientes describen recombinación meiótica en el vector transmisor del parásito (Akopyants y col., 2009). Se estima que el tamaño del genoma es de ~35 Mb (Ivens y col., 1998), que corresponde en *L. major* a 36 cromosomas (Wincker y col., 1996), 35 en *L. braziliensis* y 34 en *L. mexicana* (Britto y col., 1998), y no presentan condensación de la cromatina en mitosis (Vickerman y Preston, 1970; Hecker y Gander, 1985). El componente genómico está organizado en grandes grupos de **genes policistronicos** (PGCs, *polycistronic gene clusters*), consistentes en varios genes que se encuentran organizados de forma secuencial en la misma hebra de ADN. En estos PGCs una parte de los genes está orientada hacia un telómero y el resto hacia el otro.

Esta inusual disposición génica observada en los cromosomas 1 y 3 de *L. major* (Myler y col., 1999; Martínez-Calvillo y col., 2003; Martínez-Calvillo y col., 2004), indica que la transcripción se inicia en una región divergente y se dirige bidireccionalmente hacia los extremos. Con la secuenciación del genoma completo de varias especies de *Leishmania* (www.genedb.org) (Ivens y col., 1998; Peacock y col., 2007), se ha confirmado que la mayoría de los genes de los tripanosomátidos están organizados en grandes PGCs. La práctica totalidad de estos genes **carece de intrones**, excepto el gen que codifica la enzima poli(A) polimerasa (Mair y col., 2000), y un intrón de entre 11 y 13 bases, en el ARN^{t_{Tyr}} descrito en *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. major* (Padilla-Mejía y col., 2009). Respecto a la transcripción de la información genética, en *Leishmania* no se han identificado promotores específicos para la ARN polimerasa II. En el cromosoma 1 de *L. major* la transcripción se inicia en una región denominada *strand-switch*, entre los dos PGCs divergentes (Martínez-Calvillo y col., 2003), de forma que una única región conduce a la expresión del cromosoma entero. Esta falta de promotores específicos para cada gen se traduce en una **transcripción constitutiva** del genoma (Haile y Papadopoulou, 2007), lo que implica que los genes no pueden ser regulados a través de la iniciación de la transcripción, por lo que la regulación de la expresión génica en *Leishmania* se da predominantemente a nivel post-transcripcional (Clayton, 2002; Clayton y Shapira 2007). Los **ARNs inmaduros** son **policistrónicos** (Muhich y Boothroyd, 1988; Martínez-Calvillo y col., 2003), al igual que ocurre en organismos procariotas, y la maduración para generar una unidad monocistrónica traducible se realiza a través de procesos acoplados de **trans-splicing** y **poliadenilación** (LeBowitz y col., 1993; Ullu y col., 1993; Liang y col., 2003). Estos fenómenos consisten en la adición en el extremo 5' de una secuencia de 39 nucleótidos, denominado miniexón o *spliced leader* (SL), y la adición de una secuencia de poliadeninas en el extremo 3' (Agabian, 1990). La adición del miniexón es capaz al mismo tiempo de reclutar al complejo encargado de la poliadenilación, el cual corta la secuencia que se encuentra entre 100 y 300 pb corriente arriba, mediante desplazamiento en dirección 3'-5' (Benz y col., 2005). El lugar donde se adiciona el SL está constituido por el dinucleótido AG, precedido por una región rica en pirimidinas (Huang y Van der Ploeg, 1991). El SL aporta la denominada estructura **cap4**, presente en todos los ARNm y similar a la estructura cap de

organismos eucariotas. Está constituida por 7 metil-guanosina trifosfato, con modificaciones en los primeros 4 nucleótidos, que incluyen metilaciones en la primera A y cuarto U, y una 2'-O metilación en las cuatro ribosas, m⁷Gpppm₃^{6,6,2'}Apm^{2'}Cpm₂^{3,2'}U (Bangs y col., 1992; Lewdorowicz y col., 2004). Otra característica excepcional en los tripanosomátidos es la **corrección del ARN mitocondrial o editing** (Nebohacova y col., 2004; Stuart y col., 2004), un tipo de procesamiento post-transcripcional del ARN que consiste en la eliminación o inserción de U en el ARNm. En algunos casos, al modificar la fase de lectura de la región codificante, pueden generar un ARNm funcional (Benne y col., 1986). Las secuencias no codificantes en el extremo 3' del ARNm (3'UTR) y previas a la cola poli(A), pueden tener un papel regulador en el procesamiento y en la estabilidad de ciertos mensajeros (Clayton 2002; Haile y Papadopoulou 2007). Así, la zona 3'UTR del ARNm de la amastina en *L. infantum* presenta una región de 450 pb que favorece la expresión de genes específicos en el amastigote (Boucher y col., 2002). Las diferencias de estado en el metabolismo y la ultraestructura parecen, por tanto, estar mediadas por una combinación de cambios en la traducción de proteínas, recambio y modificaciones post-traduccionales.

Referente a la **síntesis de proteínas** se han descrito factores homólogos al complejo eIF4F eucariota mediante comparación de la secuencia de aminoácidos. En *L. infantum*, la proteína Leif es similar al factor de iniciación eIF4A con la misma actividad ARN-helicasa dependiente de ATP, pero es incapaz de complementar la eliminación de los genes TIF1 y TIF2 que codifican eIF4A en un sistema *in vivo* en levaduras (Barhoumi y col., 2006). También se han caracterizado otras subunidades homólogas del factor eIF4F y su capacidad de unión a la estructura cap4 (Lewdorowicz y col., 2004; Yoffe y col., 2004; Dhalia y col., 2005), así como la interacción entre los factores LeishIF4E y LeishIF4G (Yoffe y col., 2004). Otro factor importante en la formación de estos complejos es la proteína de unión a la cola poli(A), descrita también por homología de secuencias en *L. amazonensis* (Silva Junior y col., 2002) y *L. major* (Bates y col., 2000).

Es posible que la activación de receptores, canales específicos o quinasas conduzcan a la diferenciación de *Leishmania*, aunque las señales concretas y su transmisión a las dianas responsables están poco definidas. En otros eucariotas las proteínas activadas por mitógenos MAPKs juegan un papel importante en la regulación de la **respuesta celular** frente a estrés o señales de nutrientes (Chang y Karin, 2001). En el proyecto genoma de *L. major* se describen 179 proteínas quinasas homólogas a las de eucariotas (Parsons y col., 2005), lo que representa aproximadamente un 2% del total, identificándose 15 MAPKs con el motivo conservado TXYXXRXRYRXPE, que también se encuentran en *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis* (Wiese, 2007).

3. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN EUCARIOTAS

El funcionamiento normal de las células vivas depende de la acción coordinada de muchos sucesos moleculares, entre ellos la traducción o síntesis de proteínas. Este mecanismo esencial consiste en la generación de una cadena de aminoácidos a partir de un mensajero maduro, proceso que implica la participación de un gran número de elementos moleculares: ARNr, ARNm, ARNt, proteínas ribosomales, aminoácidos, enzimas y factores proteicos que conforman complejos que regulan y facilitan la interacción de todos los componentes. La traducción consiste en tres fases (Pestova y col., 2007): iniciación, que media la interacción anticodon iniciador (ARNt^{Met}) y codon de inicio AUG; elongación, durante la cual la adición de aminoácidos es conducida por el desplazamiento del ribosoma y la lectura de la secuencia del ARNm en dirección 5'→3'; y terminación, con el reconocimiento del codon de parada y liberación del polipéptido (Gingras y col., 1999; Preiss y M, 2003; Sonenberg y Dever, 2003; Abbott y Proud, 2004).

3.1. Etapa de iniciación

En eucariotas, durante esta etapa se promueve el ensamblaje de las subunidades ribosomales grande (60S) y pequeña (40S), para formar el complejo 80S. Para que esto se produzca, intervienen al menos 11 proteínas diferentes denominadas factores de iniciación eucarióticos (eIFs) (Holcik y Sonenberg, 2005), que reconocen al ARNm y

posicionan el anticodon del ARNt iniciador, sobre la señal de iniciación. En el inicio, los ribosomas se encuentran en su forma disociada, con la intervención de los factores de iniciación eIF1A y eIF3 (Figura 3). Las distintas fases (Kapp y Lorsch, 2004) que comprende esta etapa son: i) **formación del complejo de preiniciación de 43S**, en la cual el factor eIF2 asociado a un Met-ARNt^{Met} y una molécula de GTP (Met- ARNt^{Met}·eIF2-GTP; complejo ternario) se asocian con la subunidad 40S del ribosoma. La unión de varios factores como eIF1, eIF1A, eIF3 y eIF5 estabiliza el complejo. Por otro lado, el factor eIF2 en la forma eIF2-GDP es inactivo y es necesaria su unión a GTP para que una el ARNt^{Met}, lo cual está regulado por el factor eIF2B (Pestova y col., 2007); ii) **formación del complejo 48S**, producido por la unión del complejo de preiniciación 43S al extremo 5' del ARNm, cuando se encuentra asociado al complejo eIF4F. Este grupo de proteínas está constituido por el factor eIF4E, que reconoce y une la estructura *cap*; eIF4A, proteína ARN helicasa dependiente de ATP e implicada en desorganizar estructuras secundarias en el extremo no codificante 5'UTR; y el factor eIF4G, que actúa como adaptador múltiple aproximando varios componentes de la maquinaria necesaria para la traducción. El acercamiento del complejo 43S a la estructura *cap* es facilitado por la interacción de eIF3/eIF5 con eIF4G/eIF4B (Sonenberg y Hinnebusch, 2007). De esta forma eIF4G interacciona simultáneamente con eIF3, eIF4A, eIF4E y con la proteína de unión a la secuencia poli(A) del ARNm (PABP), que facilita el inicio de la traducción, favoreciendo la aproximación de los extremos 5' y 3' (Holcik y Sonenberg, 2005; Gebauer y Hentze, 2007). En esta disposición de bucle del ARNm, la subunidad 40S recorre (modelo de rastreo o *scanning*) la zona 5' UTR hasta encontrar el codon de iniciación de la traducción con gasto de ATP (Kozak, 1989). En este proceso participan eIF4A, eIF4B y eIF4H (Holcik y Sonenberg, 2005). En el rastreo y reconocimiento del triplete iniciador AUG participan también los factores eIF1A y eIF1 (Pestova y col., 1998), siendo este último determinante en la selección correcta del codon iniciador (Gebauer y Hentze, 2007). Finalmente la unión del complejo 43S al codon AUG da lugar a la formación del complejo iniciador 48S y se produce la hidrólisis del GTP unido a eIF2 y su liberación en forma de eIF2-GDP inactivo. Al mismo tiempo se liberan los factores eIF1, eIF1A y eIF3. (Holcik y Sonenberg, 2005; Gebauer y Hentze, 2007); iii) **unión de la subunidad ribosomal 60S y ensamblaje del**

4. LA PROTEÍNA PABP

Existe un gran número de proteínas con capacidad de unión a ácidos nucleicos. Entre éstas, las que reconocen secuencias homopoliméricas poliadeniladas en el extremo 3'UTR de los ARNm se denominan proteínas de unión a poli(A) o *Poly(A)-binding proteins* (PABPs). Descritas en varios organismos, presentan un tamaño de entre 70 y 80 kDa (Baer y Kornberg, 1983; Adam y col., 1986; Grange y col., 1987; Drawbridge y col., 1990; Yang y Hunt, 1992) y se disponen en múltiples copias formando complejos ribonucleoproteicos sobre la cola de poli(A) del ARNm. Dentro de la familia de proteínas que unen ARN, la proteína PABP es la que presenta mayor tamaño en eucariotas y es cuantitativamente la más abundante (Adam y col., 1986). Aislada en 1973 por Blobel (Blobel, 1973), y más tarde purificada a partir de un homogeneizado celular por Baer y Kornberg en 1983, en humanos se han descrito tres tipos de proteínas PABPs: i) citoplasmáticas (PABPC1, ePABP (embriónica), PABPC2/C3 (tPABP, en testis), PABPC4 (iPABP, inducible)); ii) nuclear PABPN1 y iii) PABP ligada al cromosoma X o PABPC5. Las PABPs están implicadas en la biogénesis, traducción y estabilidad de los ARNm (Gray y col., 2000; Grosset y col., 2000; Kühn y Wahle, 2004).

En humanos, la proteína PABP contiene 636 aminoácidos y su estructura general está altamente conservada. El análisis de la secuencia revela cuatro dominios consenso, repetidos en tándem en el extremo N-terminal, conectados a un dominio globular C-terminal por una región flexible y rica en residuos de prolina y metionina (Adam y col., 1986; Grange y col., 1987; Burd y col., 1991; Kozlov y col., 2001; Kozlov y col., 2004). El reconocimiento y unión a poli(A) se realiza gracias a los dominios conservados del extremo N-terminal (I, II, III, IV), denominados **motivos de reconocimiento de ARN** (RRMs). Estos motivos, abundantes en eucariotas, se encuentran en varias proteínas de unión a ARN y en todos los tipos de organismos incluidos virus, procariotas (Wang y Tanaka Hall, 2001; Vermel y col., 2002; Bae y col., 2007; Clery y col., 2008; Toba y White, 2008; Stern y col., 2009) y plantas, donde están involucrados en el procesamiento del extremo 3' del ARNm del cloroplasto (Schuster y Grissem, 1991). La secuencia consenso del dominio RRM consiste en aproximadamente 90 aminoácidos con dos secuencias altamente conservadas (Adam y col., 1986; Dreyfuss, 1986; Swanson y col.,

1987; Deo y col., 1999): **RNP1** {(Lys/Arg)-Gly-(Phe/Tyr)-(Gly/Ala)-Phe/Tyr-Val/Ile/Leu-X-(Phe/Tyr)}, y **RNP2** {(Val/Ile/Leu)-(Phe/Tyr)-(Val/Ile/Leu)-(Gly/Lys-(X))-(Asn/Gly)-(Leu/Met)}, donde X es cualquier aminoácido. Tanto RNP1 como RNP2 son necesarias y suficientes para la unión al ARN en un amplio rango de especificidades y afinidades (Kenan y col., 1991; Deo y col., 1999) y aunque todos los RRMs son capaces de unir ARNm, difieren en su especificidad de unión a poli(A), donde la longitud de la cadena de adeninas juega un papel importante en la interacción con PABP (Khanam y col., 2006). Estudios en *Xenopus* y *S. cerevisiae* determinan que la combinación RRM I/II es la unidad mínima necesaria para la interacción específica al ácido nucleico (Nietfeld y col., 1990; Burd y col., 1991), mientras que RRM IV, cuando está asociado al extremo C-terminal, es el único motivo capaz de unir poli(A) en solitario (Sachs y col., 1987; Nietfeld y col., 1990). La estructura terciaria y los estudios de afinidad indican que las combinaciones RRM I/II y RRM III/IV se comportan como entidades separadas. Los dominios RRM I/II que interaccionan con la secuencia de adeninas aumentan la concentración de poli(A) cerca de RRM III/IV lo que desencadena la unión de los siguientes dominios de forma cooperativa. Por otro lado, bajo determinadas condiciones, los dominios RRM III/IV interaccionan con motivos ARE (*AU-rich elements*), secuencias ricas en A y U presentes en la región 3'UTR de determinados ARNm (Sachs y col., 1987; Sladic y col., 2004) e implicadas en la estabilidad de los mismos.

El **extremo C-terminal globular** presenta un dominio PABC (*poly(A)-binding protein C-terminal domain*) de 74 aminoácidos muy conservado en eucariotas. Este dominio está descrito en las proteínas E3 ubiquitinas también llamadas HYD (discos interplásticos de *D. melanogaster*), EDD o Rat100 (ortólogo en mamíferos) (Callaghan y col., 1998; Oughtred y col., 2002). HYD pertenece a la familia de las ligasas HECT, implicadas en la señalización con ubiquitina, y degradación por el proteasoma (Huibregtse y col., 1995; Weissman, 2001). La estructura de HYD y las de los dominios PABC en humanos, levaduras y en *T. cruzi*, han sido definidas por espectroscopía NMR y rayos X (Kozlov y col., 2010; Deo y col., 2001; Kozlov y col., 2001; Siddiqui y col., 2003) y muestran secuencias conservadas que corresponden a lugares de unión a

péptidos, lo que indica que PABC actúa como dominio de interacción entre proteínas, reclutando factores de traducción o de procesamiento del ARNm hacia complejos ribonucleoproteicos (Khaleghpour y col., 2001; Uchida y col., 2002).

El dominio C-terminal y los cuatro dominios RRMs están conectados por una **región rica en Pro**, implicada en la interacción PABP-PABP y en la unión cooperativa a la cola poli(A) (Melo y col., 2003). Esta región contiene varios residuos de Arg que son dianas para la proteína arginina metiltransferasa PRMT4 o CARM1 (Lee y Bedford, 2002; Bedford y Richard, 2005). La metilación de Arg puede regular la actividad de PABP o afectar a su capacidad para interactuar con otras proteínas.

La proteína PABP es requerida para una traducción eficiente (Figura 4) debido, por una parte, a su interacción con **eIF4G** y a la circularización del ARNm (Wakiyama y col., 2000), y por otra, al unirse a la subunidad 60S (Searfoss y col., 2001). Por estos motivos se considera a PABP como un factor de iniciación de la traducción (Kahvejian y col., 2005). El dominio clave en la interacción con eIF4G es el RRM II (Kessler y Sachs, 1998; Otero y col., 1999) y el residuo M161 es crítico para esta interacción. Las mutaciones en este residuo suprimen la interacción con eIF4G, sin afectar la afinidad por el poli(A) (Groft y Burley, 2002). PABP también interacciona con proteínas como el factor **eIF4B** (Le y col., 1997) que promueve la actividad de eIF4A y el reclutamiento de la subunidad 40S. La rotura de esta asociación por caspasa 3 se correlaciona con una inhibición de la traducción (Bushell y col., 2001).

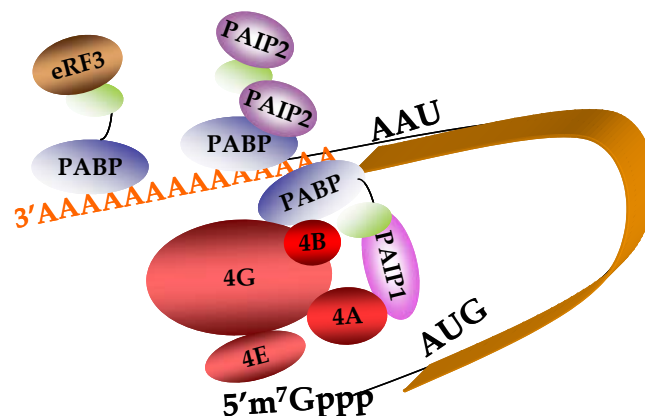


Figura 4. Interacciones de PABP con proteínas implicadas en traducción.

En células de mamíferos, la actividad de PABPC1 puede ser regulada por la unión a las proteínas **PAIP1** y **PAIP2**. PAIP1 presenta dos regiones de interacción: el motivo PAM1 (*PABP-interacting motif*) que reconoce los primeros RRM's y el motivo PAM2 que une el dominio C-terminal (Kozlov y col., 2004). La sobreexpresión de PAIP1 en células COS-7 estimula la traducción (Craig y col., 1998) y se cree que es debido a la interacción con el factor de iniciación eIF3 (Martineau y col., 2008), que actúa como puente entre el complejo ARNm-eIF4F y el ribosoma (Gingras y col., 1999; Hinnebusch 2006). La interacción de eIF3 con PAIP1 estabiliza la unión eIF4G-PABP. Por otro lado, dos moléculas PAIP2 inhiben la traducción al desplazar la proteína PABP del ARNm (Khaleghpour y col., 2001).

El control de la traducción de ARNm específicos normalmente se realiza a través de elementos que interaccionan con las regiones 5'UTR y 3'UTR del mensajero. La unión de PABP al extremo 3'UTR del ARNm-YB-1 aumenta su traducción (Skabkina y col., 2003), y la interacción con el ARE de los ARNm-TNF, previene la deadenilación provocada por la tristetrapolina cuando se une a la misma región (Rowlett y col., 2008). Por otro lado, el ARNm de PABP contiene una región rica en adeninas en su 5'UTR y varios estudios sugieren que PABP regula su propia expresión uniéndose a estas regiones (de Melo Neto y col., 1995; Wu y Bag 1998; Patel y col., 2005). PABP evita la degradación del ARNm inhibiendo el ensamblaje de la exonucleasa 3'-5' que participa en la deadenilación del extremo 3' (Ford y col., 1997). Por otro lado, PABP forma parte de un complejo multiproteico el cual se forma en la región 3' de los ARNm que contienen secuencias ARE (Wilusz y col., 2001). La unión del factor desestabilizante hnRNPD a la región ARE altera la interacción entre PABP y eIF4G, y facilita el acceso de la poli(A)-ribonucleasa que promueve la deadenilación (Chen y col., 2001); sin embargo factores estabilizantes como HuR aumentan la afinidad de PABP a poli(A) y bloquean la degradación del ARNm. Por otra parte, la asociación de PABP con **eRF3** aumenta la eficacia de la terminación (Hoshino y col., 1999; Ivanov y col., 2008) (Figura 4), y la unión con **Unr** (*up-stream of N-ras*) estabiliza mensajeros que contienen mCRD, determinante de inestabilidad presente en el ARNm *c-fos* (Grosset y col., 2000; Chang y col., 2004). Además PABP interacciona con el gen supresor de tumores **BRAC1** (Dizin y

col., 2006), con la ataxina-2 humana (**ATX2**) (Ralser y col., 2005), y con la proteína antiproliferativa **TOB** (Okochi y col., 2005).

5. APTÁMEROS

En la teoría del origen de las especies por medio de la selección natural, Darwin definía tres aspectos fundamentales: la variación dentro de los caracteres, la presión de la selección y la transmisión de los caracteres expuestos a la selección a las siguientes generaciones. En 1990, tres grupos de investigadores describieron por primera vez y de forma independiente, un mecanismo de selección molecular *in vitro* (Green y col., 1990; Robertson y Joyce, 1990; Tuerk y Gold, 1990). Este proceso de selección es denominado **método SELEX** (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment), y consiste en la identificación de moléculas con una alta afinidad por un ligando (aptámeros), a partir de librerías complejas de oligonucleótidos obtenidas por síntesis química combinatoria. Cada oligonucleótido de ADNmc comprende una región central de 20-80 nucleótidos en disposición aleatoria y dos regiones flanqueantes de secuencia conocida de 18-21 nucleótidos de longitud (Figura 5). Estas secuencias invariables actúan como lugar de unión de los cebadores en los pasos de amplificación. La diversidad molecular de una librería de oligonucleótidos depende del número de nucleótidos al azar que contenga cada molécula y de las estructuras que estas sean capaces de adoptar.

En el proceso de selección, se incuba la librería de oligonucleótidos con la molécula diana en un tampón determinado y a una temperatura dada. Durante este paso, un número muy pequeño de secuencias individuales tiende a interactuar específicamente con la molécula diana, y estas secuencias son aisladas del resto de la librería utilizando diferentes técnicas físicas de separación. Las secuencias que se unen a la molécula diana son amplificadas para obtener una librería enriquecida que es usada durante el siguiente ciclo de selección-amplificación. La eficacia del enriquecimiento en moléculas que interactúan con alta afinidad es dirigida por la astringencia de la selección en cada ciclo, obteniéndose una nueva población enriquecida con ligandos que presentan mayor afinidad por la diana. A partir de esta

población y mediante clonaje en plásmidos se obtienen oligonucleótidos individuales denominados aptámeros, que posteriormente serán caracterizados.

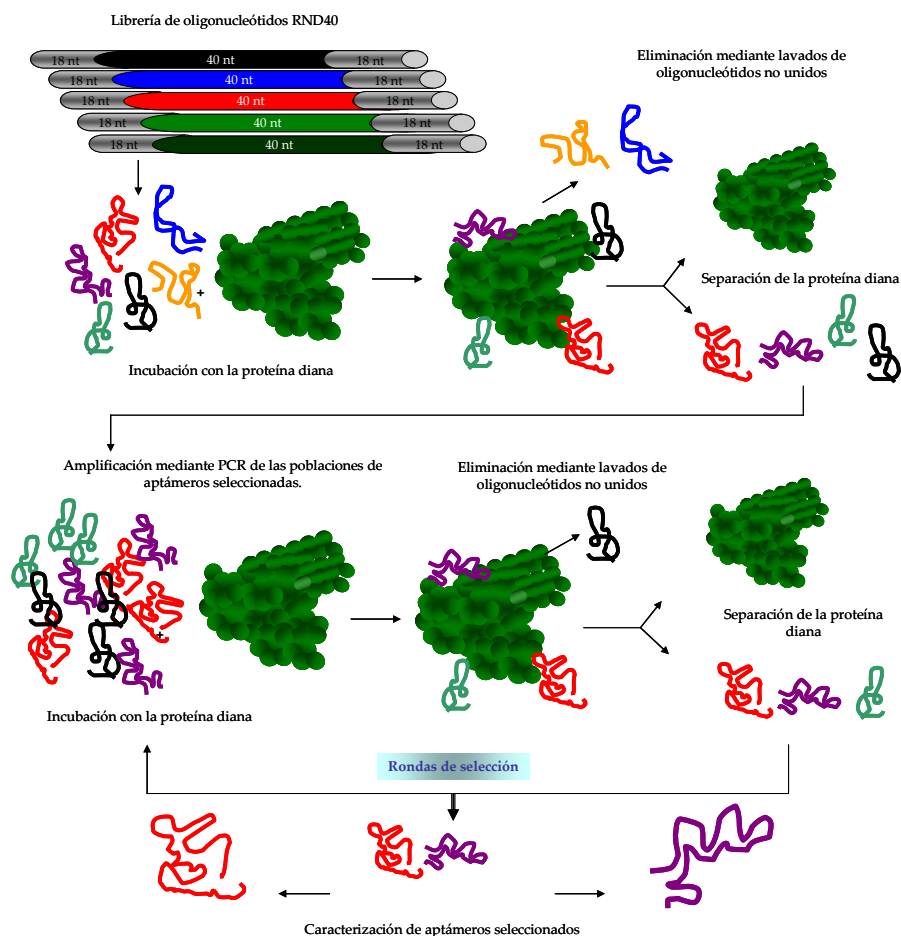


Figura 5. Metodología SELEX. Esquema de las rondas de selección-amplificación.

Los **aptámeros**, término que deriva de la palabra latina “aptus” que significa ligado y de “meros” que significa molécula (Ellington y Szostak, 1990), son moléculas de ARN o ADNmc capaces de reconocer de forma estable, con alta afinidad y de forma específica una molécula diana debido a la **estructura globular** que son capaces de adoptar. La unión del aptámero, que presenta formas complejas como son tallos, horquillas, motivos *pseudoknots*, tríplex, etc, a la diana es el resultado de una combinación de interacciones intermoleculares en el complejo de unión, que consisten en fuerzas de complementariedad de bases, interacciones electrostáticas, fuerzas de van der Waals, y puentes de hidrógeno (Hermann y Patel, 2000). Uno de los aspectos más interesantes en la metodología SELEX es su gran versatilidad, lo que permite seleccionar aptámeros capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas (Jenison y col., 1994), de muy distinta naturaleza, y entre diferentes conformaciones de

una misma proteína (Rhie y col., 2003; Sekiya y col., 2005). En la bibliografía se han descrito aptámeros frente a moléculas inorgánicas (Hofmann y col., 1997), orgánicas de pequeño tamaño (Grate y Wilson, 2001), proteínas (Stoltenburg y col., 2005), carbohidratos (Masud y col., 2004), nucleótidos (Sazani y col., 2004), antibióticos (Berens y col., 2001), e incluso células (Shangguan y col., 2006; Mallikaratchy y col., 2007), tejidos y organismos enteros (Chen y col., 2007). Los diferentes experimentos SELEX demuestran que la selección es posible para, en principio, cualquier diana que se encuentre en cantidad suficiente y con alto grado de pureza. Existe una base de datos con una relación de todos los aptámeros publicados frente a diversas dianas <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.

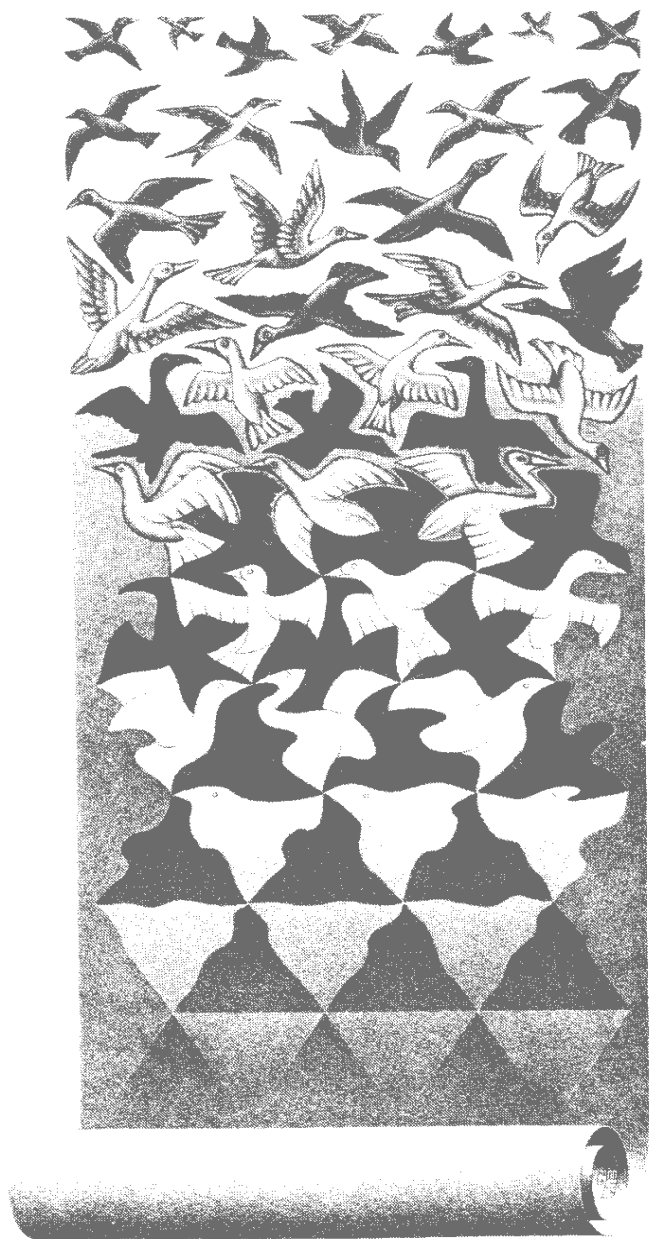
En muchos aspectos, la población de aptámeros enriquecida podría asemejarse a anticuerpos policlonales, y los aptámeros individuales obtenidos a partir de la población, podrían asemejarse a anticuerpos monoclonales (Liss y col., 2002; Chen y col., 2007); por consiguiente, el uso de estas moléculas estaría indicado para todas las aplicaciones que utilizan anticuerpos. Los aptámeros se pueden obtener frente a proteínas no inmunogénicas. Además, y gracias a su naturaleza nucleotídica que permite modificar, introducir grupos funcionales y reproducir con rapidez, y a la facilidad con la que son aislados y seleccionados sin necesidad de sistemas vivos para su producción, proporcionan grandes ventajas frente a los anticuerpos.

La interacción entre los aptámeros y sus dianas, y los efectos que producen en determinados procesos y mecanismos reguladores celulares, se utilizan tanto en investigación básica, como en el desarrollo de nuevas herramientas para terapias y métodos de diagnóstico en medicina. En los últimos años se ha comercializado la primera droga basada en esta metodología (Macugen®, Eyetech Pharmaceuticals, Inc., New York, NY, USA), compuesta por un aptámero que une e inhibe a la isoforma del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF implicada en la degeneración macular relacionada con la edad, reduciendo el crecimiento patológico de ciertos vasos sanguíneos. En lo que respecta al tratamiento del cáncer se han descrito recientemente aptámeros que parecen tener un elevado potencial como agentes terapéuticos

(Mallikaratchy y col., 2007; Tang y col., 2007; Phillips y col., 2008; Sefah y col., 2009), con capacidad para internalizarse en células acoplados a ARN de interferencia (Chu y col., 2006a; McNamara y col., 2006), conjugados con toxinas (Chu y col., 2006b) o con drogas (Bagalkot y col., 2006).

Durante los últimos años se han publicado varios artículos en los que se describen aptámeros frente a proteínas de parásitos. Así, hasta el momento, se han descrito algunos que inhiben la formación *in vitro* de hemozoína y disminuyen el crecimiento de parásitos del género *Plasmodium* (Niles y col., 2009), y otros que detectan componentes de la matriz extracelular y bloquean *in vitro* la adhesión en *Trypanosoma cruzi* (Ulrich y col., 2002; Homann y col., 2006). Aptámeros frente a *Trypanosoma brucei* interfieren en el reconocimiento celular (Homann y col., 2006) y, en el mismo parásito, un aptámero que reconoce una proteína de 42 kDa en el saco flagelar es internalizado y transportado a los lisosomas (Homann y Goring, 2001). En el género *Leishmania*, se han obtenido aptámeros frente a la proteína de membrana del kinetoplasto KMP-11 (Moreno y col., 2003), las histonas H2A y H3 (Ramos y col., 2007; datos del laboratorio) y frente a dominios del ARNt citoplásmico con objeto de estudiar los mecanismos de importación al kinetoplasto (Bhattacharyya y col., 2002).

Los aptámeros que interaccionan con proteínas que regulan los pasos de iniciación en la síntesis de proteínas inhiben la capacidad de la traducción cap-dependiente. Así, aptámeros diseñados frente al factor eIF4E inhiben la síntesis de proteínas, pero no su interacción con 4EBP1 (Mochizuki y col., 2005), y frente a eIF4A, inhiben la hidrólisis de ATP, pero no interfieren en la unión a eIF4G (Oguro y col., 2009). Se han seleccionado varios aptámeros frente al factor eIF4G con capacidad para detener la traducción del ARNm. Algunos de estos aptámeros se unen a las regiones que interactúan con eIF4A y eIF3, mientras que otros, sorprendentemente, inhiben con más actividad la traducción cap-dependiente por un mecanismo desconocido por el momento (Miyakawa y col., 2006).



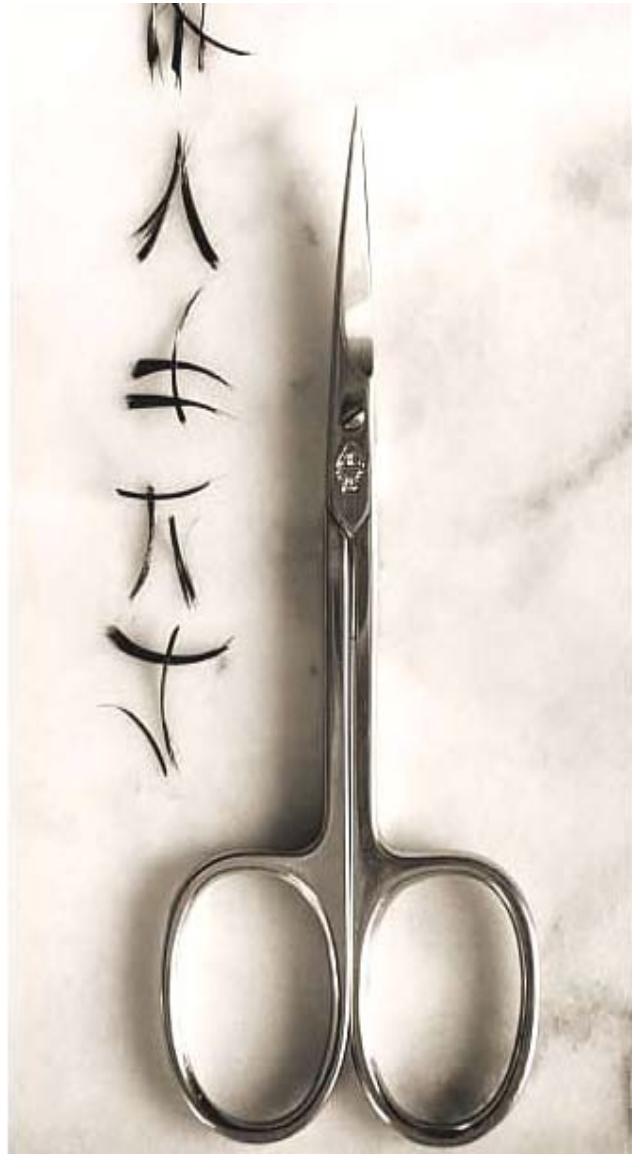
OBJETIVOS

*Todo lo difícil empieza siendo fácil, y toda
cosa grande empieza siendo pequeña.
Un viaje de cien millas empieza a nuestros pies*
Lao Tse

Leishmania es el protozoo responsable de la leishmaniasis, una enfermedad que incluye un amplio espectro de síntomas clínicos que varían desde lesiones cutáneas que curan espontáneamente hasta infecciones viscerales que pueden llegar a conducir a la muerte del paciente. El descubrimiento de nuevas proteínas y su actividad en el parásito, puede ayudarnos en el conocimiento de la biología de *Leishmania* y en la identificación de nuevas diana para desarrollar drogas antiparasitarias.

Los aptámeros son moléculas de ARN o ADNmc capaces de reconocer con alta afinidad y de forma específica una molécula blanco. La facilidad en el aislamiento y la posibilidad de introducir modificaciones en los mismos, muestran a los aptámeros como potentes herramientas diagnósticas y terapéuticas en diferentes áreas de la biomedicina y la biotecnología. Un conjunto de aptámeros específicos para proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas sería de gran valor para el estudio del mecanismo de iniciación de la traducción en *Leishmania*, ya que gran parte del proceso es desconocido y tendrían un gran potencial diagnóstico y farmacológico.

- Identificación y caracterización de la proteína de unión a poli(A) en *Leishmania infantum*, LiPABP, homóloga a la proteína de unión a la cola poli(A) de los ARNm, PABP, de otros eucariotas.
- Selección, mediante enriquecimiento exponencial en presencia de ligando (SELEX), de oligonucleótidos (aptámeros) capaces de interactuar específicamente con la proteína LiPABP.
- Caracterización de los aptámeros frente a LiPABP en el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas.



MATERIAL Y MÉTODOS

Give us the tools and we will finish the job
Winston Churchill

1. MATERIAL

1.1. Líneas celulares

Parásitos. Se emplean promastigotes que proceden del clon de *Leishmania infantum* MCAN/ES/96/BCN150, cedido por el Dr. Soto (Folgueira y col., 2005).

Bacterias. Para la producción de plásmidos se utilizan las cepas de *Escherichia coli*:
-JM109 (Promega, EEUU) (Hanahan, 1983), [*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* ($\text{rK}^- \text{mK}^+$), *relA1*, *supE44*, $\Delta(\text{lac-proAB})$, [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZΔM15*]].
-M15[pREP4] (Qiagen, Alemania) (Farabaugh, 1978), [*NaI^s*, *Str^s*, *Rif^s*, *thi⁻*, *lac⁻*, *ara⁺*, *gal⁺*, *mtl⁻*, *F⁻*, *recA⁺*, *uvr⁺*, *lon⁺*].

Sistema Eucariota. Los ensayos se realizan en **HEK293T** (ATCC# CRL-1573), línea celular epitelial originada y derivada de riñón humano embrionario, que contiene el antígeno T del virus SV40 que facilita la replicación de plásmidos con el origen SV40, en **MCF-7** (ATCC# HTB-22), línea celular humana derivada de adenocarcinoma de pulmón, y en **HepG2** (ATCC# HB-8065) células de carcinoma hepatocelular humano.

1.2. Medios de cultivo

Para parásitos

-RPMI 1640 completo. Este medio se prepara para cultivar *in vitro* formas de promastigotes de *L. infantum*. Está compuesto por RPMI 1640 1x (PAA, Austria) enriquecido con un 10% (v/v) de suero bovino fetal (SBF) (PAA, Austria), inactivado previamente a 56°C durante 30 min, y un preparado de antibióticos con penicilina 10 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, Reino Unido). Se esteriliza por filtración a través de membranas de 0,22 µm (Millipore, EEUU).

Para bacterias

-Medio líquido LB (*Miller's LB Broth*) (Conda, España). Para cultivos bacterianos en medio líquido y contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levaduras y 10 g/l de NaCl.

-Medio agar LB (*Miller's LB Agar*) (Conda, España). Para crecimiento bacteriano en medio sólido, y se elabora con medio líquido LB y 15 g/l de agar bacteriológico.

Otros compuestos

-Ampicilina (Amp) (Sigma-Aldrich, EEUU). Se utiliza para seleccionar las bacterias portadoras de plásmidos que contienen el gen de la β -lactamasa. El producto de este gen (*bla*) confiere resistencia al antibiótico.

-Kanamicina (Kan) (Sigma-Aldrich, EEUU). Se añade al medio junto con Amp para la selección de bacterias M15[pREP4]. Estas células presentan un plásmido cuyo producto de expresión es el responsable de la resistencia a kanamicina.

-Isopropil- β -D-tio-galactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich, EEUU). Se agrega a los medios de cultivo de bacterias transformadas con plásmidos, que poseen el sistema de selección del operón *lac*. El IPTG inactiva el producto del gen *lacI*, represor del operón *lac*, y se induce la expresión del gen *lacZ* que codifica a la β -galactosidasa. El gen *lacZ* se localiza en los sitios de clonaje del vector de manera que cuando se clonan fragmentos de ADN se interrumpe su expresión.

-5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (Xgal) (Promega, EEUU). Este compuesto cromogénico es reconocido por la β -galactosidasa y da lugar a un producto azulado. Se adiciona al medio de cultivo junto a IPTG y permite seleccionar clones positivos de color blanco que no expresan β -galactosidasa, y negativos de color azul.

Para células eucariotas

-Medio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Para mantener en cultivo monocapa las células HEK293T, MCF-7 y HepG2 se elabora medio completo con DMEM 1x (PAA, Austria), SBF 10% (PAA, Austria), y un combinado de antibióticos y antimicótico con penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/ml y anfotericina 25 μ g/ml (Sigma-Aldrich, EEUU). La esterilización se efectúa por filtración.

-Medio DMEM 1x. Este medio se suplementa con un 10% de SBF y se emplea en lavados celulares y en mantenimiento de líneas que han sido transfectadas.

-Medio optiMEM (Gibco, Reino Unido). Necesario para conservar las micelas y ácidos nucleicos durante la transfección.

Otras componentes

Para el levantamiento químico de las células se utiliza **Tripsina 1x** (Gibco, Reino Unido) y para lavados celulares, tampón fosfato salino **PBS** (PAA, Austria).

1.3. Tampones y soluciones

Los tampones y soluciones generales se describen en la Tabla 1. Los tampones y soluciones específicos se describen asociados a cada técnica en el apartado *Métodos*.

Tabla 1. Composición de tampones y soluciones generales.

Nombre	Composición
Tampón fosfato salino (PBS)	Na ₂ HPO ₄ 10 mM, pH 7,4; NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM
Tampón lisis A	Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; ditioneitol (DTT) 1 mM; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM; benzamidina 1 mM; molibdato sódico 2 mM; β-glicerofosfato sódico 2 mM; ortovanadato sódico 0,2 mM; KCl 120 mM, 10 µg/ml de antipaina y 1 µg/ml de leupeptina y pepstatina
Tampón lisis A con detergente	Tris-HCl 20 mM, pH 7,6; DTT 1 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM; benzamidina 1 mM; molibdato sódico 2 mM; β-glicerofosfato sódico 2 mM; ortovanadato sódico 0,2 mM; KCl 120 mM, 10 µg/ml de antipaina, 1 µg/ml de leupeptina y pepstatina, Tritón X-100 1% (Sigma-Aldrich, EEUU)
Tampón de carga 3x para proteínas en gel SDS-PAGE	Tris-HCl 186 mM, pH 6,8; dodecil sulfato sódico (SDS) 9%; β-mercaptoetanol 6%; glicerol 12,3% y azul de bromofenol 0,025% (Merck, Alemania)
Tampón de carga 3x (gel no disociante)	Tris-HCl 250 mM, pH 6,8; sacarosa 12,5% y azul de bromofenol 0,025% (Merck, Alemania)
Tampón transferencia	Tris-HCl 25 mM, pH 8,3; glicina 192 mM y metanol 20%
Solución bloqueo PBS-5%	Leche en polvo desnatada 0,05 g/ml en PBS 1x

Material y Métodos

Solución incubación PBS-1%	Leche en polvo desnatada 0,01 g/ml en PBS 1x
Solución PBS-BSA-1%	Albúmina sérica bovina (BSA) 0,01 g/ml en PBS 1x
Solución PBS-Tween-0,05%	Tween 20 (Sigma-Aldrich, EEUU) 0,5 µl/ml en PBS 1x
Solución Coomassie	<i>Brilliant Blue R</i> (Sigma-Aldrich, EEUU) 0,2%; ácido acético 10% y metanol 40%
Solución desteñido Coomassie	Ácido acético 7% y etanol 20%
Solución Fast-Green	<i>Fast Green FCF</i> (Bio Rad, EEUU) 0,1%; ácido acético 10% y metanol 25%
Solución desteñido Fast-Green	Ácido acético 10% y metanol 25%
Solución Rojo-Ponceau	<i>Ponceau S</i> (Merck, Alemania) 0,1% y ácido acético 5%
Tampón revelado AP	Tris-HCl 100 mM, pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl ₂ 5 mM
Reactivo NBT	Sustrato NBT (cloruro de P-nitro azul tetrazolio) (Bio Rad, EEUU) 15 mg/ml en N,N-Dimetilformamida 100%
Reactivo BCIP	Reactivo BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (Bio Rad, EEUU) 30 mg/ml en N,N-Dimetilformamida 70%
Solución de revelado-AP	Solución NBT y Solución BCIP 1% en tampón revelado AP
Solución de eliminación de anticuerpos unidos a membrana	Glicina 1M, HCl pH 3
Tampón TAE 1x	Tris 40 mM, pH 7,4; ácido acético 0,112% y EDTA 1 mM

Los aminoácidos se suministran por Sigma-Aldrich (EEUU), los inhibidores generales de fosfatasas como β -glicerofosfato, molibdato sódico y ortovanadato sódico, y los inhibidores de proteasas benzamidina, pepstatina, leupeptina y antipaina, por Sigma-Aldrich y Merk (Alemania). Las sales, ácidos, bases inorgánicas, solventes orgánicos, etc., se proporcionan por Panreac (EEUU), Sigma-Aldrich y Merk. Los fabricantes de los colorantes y detergentes utilizados se especifican en la tabla.

1.4. Material para biología molecular

Vectores

-pBluescript SK (-) (Stratagen, EEUU). Vector de 2958 pares de bases (pb) con un largo y versátil *polylinker* o sitio múltiple de clonaje (MCS), con 21 secuencias diana para endonucleasas de restricción (ER).

-pcDNA3-Flag. Vector de 5446 pb que permite expresar el epítipo Flag (26 pb) en la región N-terminal de la proteína de fusión.

-pcDNA3-Myc. Vector de 5446 pb que adiciona la etiqueta c-Myc en la región N-terminal de la proteína de fusión.

-pQe30 (Qiagen, Alemania). Vector de expresión de 3416 pb. Está regulado por el sistema del promotor fago T5 y operador *lac*, y permite expresar 6 His consecutivas en la región N-terminal de la proteína de fusión. Se utiliza para la purificación de proteínas recombinantes en cromatografías de afinidad.

-pGEM®-T (Promega, EEUU). Vector de 3000 pb que procede de la digestión del vector pGEM®5Zf(+) con la endonucleasa *EcoRV* y posterior adición de residuos de desoxitimidina (T) a los extremos 3' en el sitio de inserción. Se utiliza como vector de amplificación para clonar fragmentos de ADN obtenidos por PCR.

Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos o cebadores utilizados tanto en los procesos de clonaje como en la secuenciación, se sintetizaron por Sigma-Aldrich, EEUU. En la Tabla 2 se señala el nombre, temperatura de fusión (T_m), porcentaje en bases G y C, y su secuencia en orientación 5'-3'. Dentro de algunas series la diana de restricción de *Bam*HI se encuentra resaltada en rojo, y el símbolo • indica el punto de corte. Algunos cebadores están marcados con digoxigenina (dig) o con biotina (bio). En la Tabla 3 se muestran secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en varios ensayos, en orientación 5'-3', y que no son utilizadas en la amplificación por PCR. El símbolo N indica cualquier nucleótido. Las secuencias RND40 se sintetizaron en Sigma-Aldrich, EEUU, y la cadena de adeninas o poli(A) en GE-Healthcare, Reino Unido.

Tabla 2. Cebadores para la secuenciación de insertos y su amplificación por PCR.

Nombre	T _m	%(G+C)	Secuencia 5' - 3'
5' LiPABP	72	60	CG G•GAT CC A TGG CCT TCA CTG GTC CGA ATC
3' LiPABP	70	59	CG G•GAT CC T CAA ACG CTC ATG TGA CGG
5' T7	51	40	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
3' SP6	48	30	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA
5' pQe	36	40	CGGATAACAATTTACACACAG
3' pQe	37	47	GTTCTGAGGTCATTACTGG
F3 5'	56	56	GCG GAT GAA GAC TGG TGT
R3 3'	54	50	GTT GCT CGT ATT TAG GGC
F3-dig 5'	55	56	(dig)-GCG GAT GAA GAC TGG TGT
R3-dig 3'	54	50	(dig)-GTT GCT CGT ATT TAG GGC
F3-bio 5'	61	56	(bio)-GCG CAT GAA GAC TGG TGT

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos de más de 50 pb.

Nombre	Secuencia 5' - 3'
RND40	GCG GAT GAA GAC TGG TGT -N ⁴⁰ - CCG CTA AAT ACG AGC AAC
Poli(A)	A ^{~100}

Reactivos

- ✦ **Sistema de clonaje:** *pGEM®-T Vector System I* (Promega, EEUU).
- ✦ **Sistema de transfección:** *Lipofectamina™ 2000* (Invitrogen, EEUU).
- ✦ **Purificación de plásmidos:** Sistemas *SpinClean™ Plasmid DNA Miniprep* (Mbiotech, Corea) y *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep* (Invitrogen, EEUU).
- ✦ **Elementos PCR:** Taq ADN polimerasa y MgCl₂ (Biotools, España); desoxirribonucleótidos (dNTPs) (Fermentas, Canadá).
- ✦ **Enzimas de restricción (ER):** *Bam*HI, *Kpn*I, *Sall*, *Xba*I y *Eco*RI (Fermentas, Canadá).
- ✦ **Tampón de digestión ER:** Tango™, Orange, Tampón-*Bam*HI (Fermentas, Canadá).
- ✦ **Fosfatasa alcalina intestinal de ternero** (CIAP) (Fermentas, Canadá).
- ✦ **T4 ADN ligasa** (Fermentas, Canadá).
- ✦ **Polímero para electroforesis:** Agarosa de uso rutinario (Sigma-Aldrich, EEUU) y agarosa MS-8 para la resolución de aptámeros (Conda, España).

- ✖ **Tinción en gel de ácidos nucleicos:** *GelStar*[®] (Lonza, Suiza).
- ✖ **Marcador peso molecular:** λ /HindIII; pUC19 DNA/MspI (Fermentas, Canadá).
- ✖ **Tampón de carga de ADN:** *6X Loading Dye Solution* (Fermentas, Canadá).
- ✖ **Sistema de purificación de ADN en gel de agarosa:** *GENECLEAN*[®] III (Q.Bio gene, Canadá).

1.5. Material para el estudio y análisis de proteínas

Reactivos y componentes

- ❑ **Cuantificación:** Reactivo Bradford (Bio Rad, EEUU), en cubetas poliestireno 1 ml.
- ❑ **Elementos SDS-PAGE:** Acrilamida, bisacrilamida y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio Rad, EEUU); persulfato amónico (GE-Healthcare, Reino Unido) y SDS.
- ❑ **Marcador peso molecular:** Full-Range Rainbow y Low Range (GE-Healthcare, Reino Unido).
- ❑ **Papel transferencia:** Munktell (GE-Healthcare, Reino Unido).
- ❑ **Membranas transferencia:** nitrocelulosa Hybond[™]-ECL[™], PVDF Hybond[™]-P (GE-Healthcare, Reino Unido).
- ❑ **Películas fotográficas:** sensibilidad normal, Fuji Medical X-Ray Film, (Fuji film Corporation, Japón); hipersensibles, Hyperfilm[™]ECL (GE-Healthcare, Reino Unido); para ensayos radioactivos Hyperfilm[™] HP (GE-Healthcare, Reino Unido).
- ❑ **Método de revelado:** ECL[™] y ECL-Advance (GE-Healthcare, Reino Unido); SuperSignal[®] (Pierce, EEUU); Sustrato BCIP y NBT (Bio Rad, EEUU).
- ❑ **Concentración de proteína:** Ultrafiltros (Millipore, EEUU) en sistema de presión Amicon[®] Separation; filtros Centricón C30[®] (Millipore, EEUU).
- ❑ **Productos radioactivos:** [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, AE 3000 Ci/mmol (Hartmann Analytic, Alemania).
- ❑ **Resinas:** Agarosa Ni-NTA, del sistema *QIAexpressionist*[™] (Qiagen, Alemania); sefarosa CNBr-activada[™] (GE-Healthcare, Reino Unido), micropartículas magnéticas con estreptavidina (Fluka Analytical (Sigma-Aldrich EEUU)).
- ❑ **Agente bloqueante de resinas:** Citocromo C (Sigma-Aldrich, EEUU).

- ❑ **Sistema de transcripción y traducción acoplado:** *TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems* (Promega, EEUU)

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las distintas inmunodetecciones, se muestran en las Tablas 4 y 5. En algunos ensayos se ha utilizado como anticuerpo primario una dilución 1/50 de sueros policlonales extraídos de perros infectados con LV canina, purificados mediante unión a resinas, donados por el Dr. Manuel Soto.

Tabla 4. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Título	Tipo y Origen	Fabricante
c-Myc-HRP	1/250	Monoclonal ratón conjugado con HRP	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
c-Myc	1/1000	Monoclonal ratón	Santa Cruz Biotechnology, EEUU
Flag	1/10000 1/5000	Monoclonal ratón	Sigma-Aldrich, EEUU
PABP	1/1000	Policlonal conejo	Santa Cruz Biotechnology, EEUU

Tabla 5. Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Título	Conjugado	Origen	Fabricante
Anti-ratón	1/2000	Peroxidasa	Oveja	GE-Healthcare, Reino Unido
Anti-conejo	1/2000	Peroxidasa	Burro	GE-Healthcare, Reino Unido
Anti-digoxigenina	1/1000	Peroxidasa	Oveja	Roche, Suiza
Anti-perro	1/10000	Peroxidasa	Oveja	Bethyl Laboratories, EEUU
Anti-ratón	1/3000	Fosfatasa Alcalina	Conejo	Sigma-Aldrich, EEUU
Proteína A	1/3000	Fosfatasa Alcalina	Conejo	Sigma-Aldrich, EEUU

1.6. Instrumentación

Para electroforesis y transferencia de ADN y proteínas

- Cubetas de electroforesis horizontal para ácidos nucleicos: Labnet International Inc.
- Sistema de electroforesis vertical para proteínas: *Mini-Protean II y III electrophoresis cell* de Bio-Rad.
- Cubeta de transferencia semi-húmeda: *Mini-Protean III* de Bio-Rad.
- Cubeta de transferencia semi-seca: *Multiphor II* de Pharmacia Biotechnology.
- Fuentes de alimentación: *EC-105 Apparatus Corporation* y *Electrophoresis Power Supply-EPS601* de Amersham Biosciences.
- Transiluminador y capturador de imágenes: *MiniBis Pro* de DNR Bio-Imaging Systems.
- Estuche de películas: Hypercassette™ 18 x 24 cm de Amersham Biosciences.

Otros

- Termociclador *iQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* de Bio Rad.
- Sonicador de varilla *Vibra cell™* de Sonics & Material Inc.
- Reveladora de FujiFilm.
- Escáner de fluorescencia y radiactividad *Typhoon 9400* de Amersham Biosciences.
- Escáner *Perfection 2450 Photo* de Epson.
- Espectrofotómetro *DU 640* de Beckmam.
- Fotómetro de placas *Spectra Fluor* de Tecan.
- Incubador seco *StableTemp* de Cole-Parmer®.
- Lector de absorbancias *2158* de LKB Brohma.
- Bomba peristáltica *Fine Chemicals* de Pharmacia Biotech.
- Espectrofotómetro *DU 640* de Nanodrop.
- Microscopio de contraste de fase *TMS* de Nikon.

Herramientas informáticas

- Escaneado: Epson Twain 5; Typhoon Scanner Control
- Densitometrado: Image Quant™ v2003.02 de GE-Healthcare, Reino Unido.
- Análisis estadístico y gráficas: GraphPad Prism v4

2. MÉTODOS

2.1. Cultivo y manipulación de células

2.1.1. Parásitos

Cultivo de *Leishmania*

Las formas promastigotes de *Leishmania* se mantienen en medio RPMI completo, en botellas estériles de 25 cm² en un incubador con ambiente saturado de humedad a 26°C. Para mantener el cultivo se procede a la resiembra de 1×10^6 células en 5 ml de medio fresco. Para la obtención de parásitos en fase estacionaria los cultivos se inician con promastigotes en estado logarítmico a una concentración de 1×10^6 células y se incuban durante 6-7 días a 26°C, sin recambio de medio de cultivo. El recuento de células se realiza en un hemocitómetro o cámara de Neubauer.

Criopreservación y descongelación

Las células se conservan en alícuotas de 1 ml de cultivo con un 20% (v/v) de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EEUU) a -196°C en nitrógeno líquido. Para recuperar los parásitos las alícuotas se descongelan a 37°C y se centrifugan a $1400 \times g$ durante 5 min. Finalmente, las células se resuspenden en 5 ml de cultivo fresco.

Obtención de extractos totales y parciales de parásitos

El cultivo de parásitos se centrifuga a $1800 \times g$ durante 15 min a 4°C y se lava con PBS dos veces. Para obtener extractos totales, las células se resuspenden en *Tampón de carga 3x para proteínas* (Tabla 1) y para obtener extractos solubles e insolubles, se realiza un lavado con *Tampón lisis A* (Tabla 1), y después se añade a las células *Tampón lisis A con detergente* (Tabla 1) en una proporción 1:2 en volumen (siendo el volumen celular el ocupado por el sedimento de células tras la centrifugación), se centrifuga a $17000 \times g$ durante 20 min a 4°C y se separan las dos fracciones, el sobrenadante soluble que corresponde a la fracción postmitocondrial (PMS) y el sedimento insoluble que contiene membranas del parásito. Se determina la concentración de proteína del PMS por el método Bradford (Bradford, 1976), y a la fracción insoluble se le añade *Tampón de carga 3x para proteínas* (Tabla 1).

2.1.2. Bacterias

Cultivo de *E. coli*

Para asegurar la existencia de una población homogénea, los cultivos líquidos en LB de *E. coli* proceden de una colonia aislada crecida en medio de cultivo sólido. Tanto los cultivos líquidos como los sólidos, se incuban de forma rutinaria a 37°C durante 16 horas. Además, el medio se suplementa con el antibiótico adecuado, Amp 50 µg/ml y/o Kan 25 µg/ml, según la resistencia que confiera el plásmido que transporta la bacteria.

Conservación

Las colonias positivas que han incluido los vectores pBSK, pcDNA3-Flag, pcDNA3-Myc y pQe30, con el inserto, se conservan a -80°C en alícuotas de 1 ml en medio de cultivo con un 20% de glicerol (v/v).

Transformación de células competentes por choque térmico

Este método físico-químico (Hanahan, 1983) se emplea para transformar *E. coli* con plásmidos que presentan un origen de replicación y un marcador de resistencia a antibiótico. Se añade entre 50-100 ng de plásmido a 50 µl de bacterias competentes JM109 y se incuba la mezcla durante 40 min en hielo, agitando a pequeños intervalos. Las células se someten a choque térmico de 42°C, durante 90 s y se mantienen en hielo durante 2 min. Las bacterias se recuperan de este proceso a 37°C añadiendo 0,7 ml de medio líquido LB sin antibiótico durante 50 min en agitación. Finalmente, las bacterias se siembran de forma homogénea en superficie, en medio sólido LB, con el antibiótico adecuado.

2.1.3. Líneas celulares eucariotas

Cultivo de HEK293T, MCF-7 y HepG2

El cultivo en monocapa de estas líneas celulares se mantiene en botellas de 75 cm² con medio DMEM completo, en un incubador en ambiente saturado de humedad con 5% CO₂, 95% de O₂ a 37°C. Las células que se utilizan en cada experimento se siembran en diferentes placas a una densidad apropiada (3 x 10⁵ para placas de 10 cm² 6 (p6), y 2

$\times 10^6$ para las de 60 cm^2). En el momento de realizar el ensayo se deben encontrar entre un 60-70% de confluencia. El recuento celular se realiza en cámara de Neubauer.

Conservación

Las células se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido en medio de cultivo con un 10% (v/v) de DMSO y densidad de 2×10^6 células/ml. Los viales se descongelan a 37°C y se centrifugan a $400 \times g$ 5 min. Las células se resuspenden en 7 ml de medio fresco en botellas de 25 cm^2 .

Transfección transitoria de cultivos celulares

La incorporación de ADN exógeno a las células eucariotas se realiza utilizando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, EEUU) según las indicaciones del fabricante y acondicionando los reactivos a cada densidad celular, tipo de placa y ensayo que se realiza. Para evitar que el antibiótico interfiera en la transfección, las células se lavan en la placa, dos veces con medio DMEM 1x y SFB 10%. Una vez que las células se encuentran en medio de cultivo libre de antibiótico, se adiciona el complejo ADN-Lipofectamina en medio optiMEM, y se disponen las placas en el incubador durante 24 horas hasta su procesamiento.

Obtención de fracción soluble de células

Las líneas celulares que se siembran en placas para los distintos ensayos, se lavan con PBS a 4°C , se recogen mecánicamente, y se centrifugan a $400 \times g$ durante 5 min a 4°C . Se lavan una vez más con *Tampón lisis A* (Tabla 1) en frío y se centrifuga a $400 \times g$ durante 5 minutos. Seguidamente se añade *Tampón lisis A* que se completa con detergente Tritón X-100 1% y se centrifugan a $12000 \times g$ durante 15 min. Las células se tratan en una proporción de células y tampón 1:2 en volumen. En todas las muestras procesadas, se aísla el sobrenadante o PMS después de la última centrifugación, y se almacena a -80°C hasta su uso. La determinación de la concentración de proteína obtenida, se realiza por el método de Bradford. Para la obtención de extracto total, las células recogidas de las placas con PBS a 4°C se centrifugan a $400 \times g$ durante 5 minutos y se añade *Tampón de carga 3x para proteínas* (Tabla 1).

2.2. Técnicas de biología molecular

2.2.1. Análisis de secuencias

Para la localización de secuencias de *Leishmania* homólogas a eucariotas superiores, se realiza la búsqueda en el genoma completo del parásito, publicado en la base de datos del Instituto Trust Sanger (<http://www.sanger.ac.uk>), y se utiliza como elemento guía la secuencia de aminoácidos que codifica para la proteína PABP humana. De esta forma se detecta una secuencia con alta homología denominada LinJ35.4250. A partir de este clon se diseñan los cebadores de 20 nucleótidos y se adiciona a la secuencia terminaciones en C ó G para mejorar el anillamiento en 3'. Se incluye el codon de inicio para el oligonucleótido en dirección 5', y de terminación para la dirección 3', además de la secuencia diana para la endonucleasa de restricción *Bam*HI en las dos direcciones (Tabla 2). La deducción de la proteína a partir de la secuencia de ADN, se realiza con el programa ExPASy, (www.expasy.ch) del Instituto de Bioinformática Suizo (SIB), así como los cálculos de peso molecular y punto isoelectrico. La determinación de dominios conservados se realiza con el programa SMART (Letunic y col., 2009) del Laboratorio de Biología Molecular Europeo (EMBL) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). La historia evolutiva de proteínas de unión a cola poli(A) PABPs, se construye a partir de secuencias no redundantes, recopiladas en formato FASTA de la base de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov) del Centro Nacional de Información sobre Biotecnología (NCBI). Los números de identificación para acceder a la secuencia de cada organismo se detallan en la Tabla 6. El árbol radial de filogenia y el filograma se calcula mediante el método de distancias de unión al vecino o *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), utilizando el programa MEGA4 (Tamura y col., 2007).

La comparación de secuencias y el cálculo de identidades entre proteínas homólogas se realiza con el programa CLUSTALW2 (Thompson y col., 2002) (www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/index.html), del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI). Para la localización de posibles sitios funcionales se utiliza el servidor ELM (<http://elm.eu.org/news.html>). La representación en tres dimensiones se realiza con la secuencia de la proteína en formato *pdb* y el programa SWISS -PdbViewer (Peitsch y col., 1995; Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009) del SIB. Finalmente las estructuras

secundarias de los aptámeros se obtienen del programa Mfold (Mathews y col., 1999; Zuker, 2003) (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>).

Tabla 6. Proteínas PABPs homólogas.

Proteína	Organismo	Nº de secuencia
PABP	<i>Aedes aegypti</i> (A. aegypti)	GI157125853
PAB5	<i>Arabidopsis thaliana</i> (A. thaliana)	GI15217573
PABP	<i>Babesia bovis</i> (B. bovis)	GI156086682
PABP	<i>Bombyx mori</i> (B. mori)	GI148298695
PABP1	<i>Bos taurus</i> (B. taurus)	GI41386798
PAB-1	<i>Caenorhabditis elegans</i> (C. elegans)	GI71993217
PABP1-2	<i>Canis lupus familiaris</i> (C. lupus)	GI773974158
PABPC1	<i>Danio rerio</i> (D. rerio)	GI72534835
PABPA	<i>Drosophila melanogaster</i> (D. melanogaster)	GI17136378
PABP1	<i>Equus caballus</i> (E. caballus)	GI194215016
PABPC1	<i>Gallus gallus</i> (G. gallus)	GI71896197
PABPC1	<i>Homo sapiens</i> (H. sapiens)	GI46367787
PABP	<i>Leishmania braziliensis</i> (L. braziliensis)	GI154345147
PABP1	<i>Leishmania major</i> (L. major)	GI6019464
PABPC1	<i>Mus musculus</i> (M. musculus)	GI31560656
PABPC1	<i>Pan troglodytes</i> (P. troglodytes)	GI114682135
PABP	<i>Plasmodium falciparum</i> (P. falciparum)	GI119352249
PAB1P	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S. cerevisiae)	GI6321013
PABP	<i>Schistosoma mansoni</i> (S. mansoni)	GI256075089
PABPC1	<i>Taeniopygia guttata</i> (T. guttata)	GI224046575
PABP	<i>Tribolium castaneum</i> (T. castaneum)	GI91094515
PABPI	<i>Trypanosoma brucei</i> (T. brucei)	GI4104919
PABP	<i>Trypanosoma cruzi</i> (T. cruzi)	GI71659778
PABP1-A	<i>Xenopus laevis</i> (X. laevis)	GI148232824

2.2.2.Extracción de ADN

Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala se sigue el protocolo de aislamiento del sistema *SpinClean™ Plasmid Miniprep* (Mbiotech, Corea) que consiste en una cromatografía en columna de adsorción donde la unión a la membrana de sílice y la posterior elución de los ácidos nucleicos se efectúa en presencia de sales caotrópicas.

Para el aislamiento a gran escala se utiliza el procedimiento descrito en el sistema *The PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep* (Invitrogen, EEUU) donde se produce un intercambio reversible de los iones de los ácidos nucleicos en solución, con grupos funcionales unidos covalentemente a la fase estacionaria insoluble de la resina.

2.2.3. Procesamiento y manipulación del ADN aislado

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Erlich, 1989)

La PCR se realiza para la amplificación de fragmentos para el clonaje en pBSK y para verificar que colonias bacterianas han internalizado el plásmido con el inserto específico. La temperatura requerida para la unión del cebador se establece para cada cebador, según su temperatura de separación de hebras o *melting* (T_m) (Tabla 2). Si en la misma reacción los cebadores difieren en su T_m , se opera con una temperatura 5°C por debajo de la T_m inferior de los dos oligonucleótidos. Las reacciones se realizan con cebadores en direcciones 5' y 3' a 1 μ M, 62,5 μ M de cada uno de los dNTPs, 2 mM de $MgCl_2$ y 1,25 U de Taq Polimerasa en un volumen final de 25 μ l. Todas las reacciones se llevan a cabo en un Termociclador *iQ™5* con las características descritas en la Figura 6.

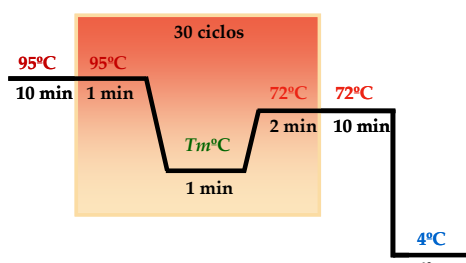


Figura 6. Programa de PCR de amplificación de insertos.

Tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción

La reacción de digestión se realiza, en el tampón adecuado para cada ER. La actividad, la temperatura óptima y la inactivación enzimática, vienen indicadas por la casa comercial. Para evitar recircularizaciones del vector digerido, se trata con una fosfatasa alcalina bovina intestinal (CIAP), bajo las condiciones indicadas por el fabricante. Esta enzima elimina un grupo fosfato en el extremo 5' del plásmido vector.

Reacción de ligación de ADN

La reacción de ligación de fragmentos de ADN en vectores plasmídicos, se lleva a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas, Canadá) que procede del bacteriofago T4 y cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' fosfato y 3' hidroxilo del ADN. La reacción de ligación se optimiza para cada construcción según el tamaño del vector y se emplea una relación molar 3:1 (ADN:vector). El volumen de la reacción es de 20 µl y las reacciones se desarrollan a 16°C durante una noche. En todos los casos se utiliza el tampón T4 ADN ligasa (Fermentas, Canadá) y 3 U de enzima. La inactivación enzimática se produce a 65°C durante 15 minutos y la mezcla de ligación se utiliza para transformar *E. coli* competentes. Los transformantes positivos se identifican mediante amplificación del inserto.

2.2.4. Electroforesis de ADN

Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos procedentes de amplificación por PCR, digestiones con ER y control de calidad en el aislamiento de ADN plasmídico, se realizan geles de 1% de agarosa en *Tampón TAE 1x* (Tabla 1) y una dilución 1/10000 de *GelStar® Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, Suiza), el cual se intercala entre las cadenas de ADN y permite observar las diferentes bandas cuando es expuesto a la luz ultravioleta en un transiluminador *MiniBis Pro*. La electroforesis horizontal se desarrolla en el mismo tampón del gel, a un voltaje de 100 V durante 1 hora. Las muestras se cargan en *Tampón de carga 6x* (Fermentas, Canadá) y se utiliza el marcador de peso molecular λ /*HindIII*.

Purificación de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se recuperan de los geles de electroforesis seccionando con un bisturí la porción de agarosa que contiene la banda del ácido nucleico. Mediante el sistema *GENECLEAN® III* (Q.BIOgene, Canadá) y según las indicaciones de la casa comercial, los ácidos nucleicos son retenidos por una resina en presencia de NaI que disuelve la agarosa.

2.2.5. Diseño de construcciones plasmídicas

Para obtener la secuencia seleccionada en el genoma de *L. infantum* se procede a su clonaje en el vector de expresión en bacterias pBluescript SK (-).

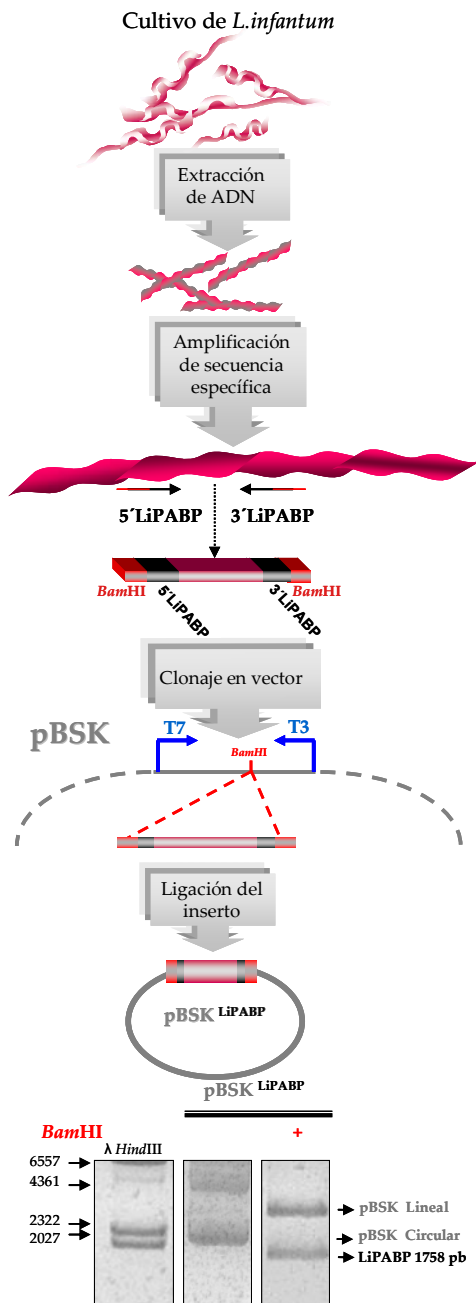
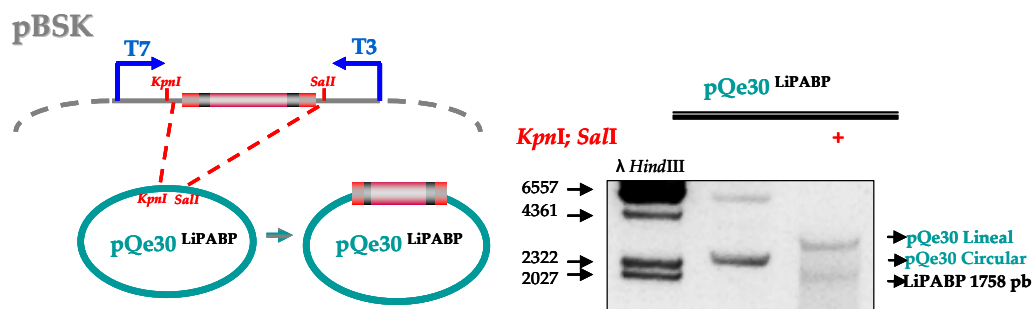


Figura 7. Clonaje de la secuencia desde promastigotes de *L. infantum*.

La secuencia se obtiene mediante PCR utilizando como molde ADN obtenido de promastigotes de *Leishmania* y los cebadores 5' LiPABP y 3' LiPABP (Tabla 2), que contienen la secuencia diana de la ER *Bam*HI que flanquea al triplete de iniciación. Así, el producto que se obtiene por PCR y el vector pBluescript SK (-) se tratan con la misma enzima. Se confirma la correcta inserción del inserto mediante digestión con las mismas ER del clonaje y mediante secuenciación del inserto (Figura 7). Para la obtención de la proteína recombinante, el inserto correspondiente a LiPABP se subclona en el vector de expresión pQe30 que introduce en el extremo N-terminal de las proteínas 6 His consecutivas. Para ello se extrae el inserto del vector pBluescript SK (-) mediante digestión con las enzimas *Kpn*I y *Sal*I (Figura 8A) y se introduce en el vector bacteriano, previamente digerido con las mismas enzimas.

Para el estudio de expresión de proteínas en células eucariotas, se realiza el subclonaje del ADNc (pBluescript SK), utilizando las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, en diferentes versiones del vector de expresión en células de mamífero pcDNA3 (Flag y c-Myc) (Figura 8B).

A



B

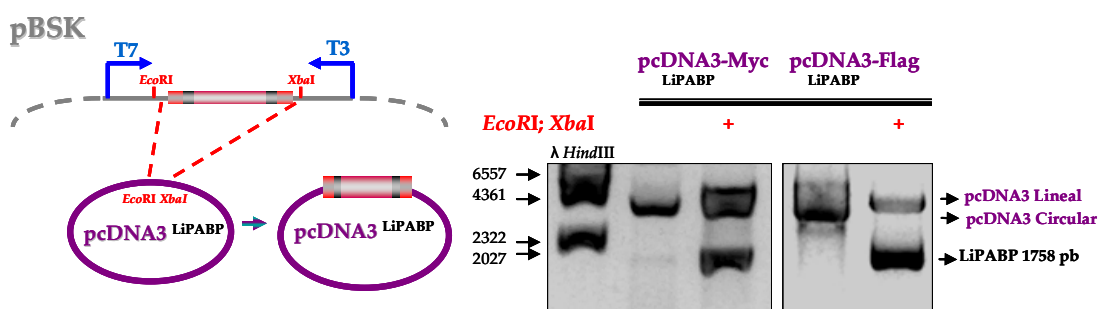


Figura 8. Subclonaje en los vectores pQe30 y pcDNA3

La ligación de los insertos con el vector correspondiente y su posterior transformación en bacterias competentes se describe en el apartado 2.2.3 y 2.1.2 respectivamente. Las colonias transformantes positivas que se obtienen, se verifican mediante digestión con las correspondientes ER y PCR con los cebadores específicos del inserto o con los cebadores que flanquean los insertos y que son propios de cada vector (Tabla 2); T7 y 3' LiPABP para las construcciones en pBSK, T7 y Sp6 para las construcciones en pcDNA3, y 5' pQe y 3' pQe para los clonajes en pQe30. Finalmente todas las secuencias del inserto se confirman mediante secuenciación.

2.3. Técnicas de separación y análisis de proteínas

2.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Las proteínas se resuelven en geles de poliacrilamida según los métodos estándar descritos por Sambrook y col., (1989), con el sistema vertical de proteínas *Miniprotean III* (BioRad, EEUU). Se realizan geles de poliacrilamida del 7,5%, 10% y 12% (% acrilamida/ % bisacrilamida), en condiciones reductoras y desnaturalizantes (SDS-PAGE) y como agentes polimerizantes se utilizan N-N-N'-N'-tetrametilen-diamina (TEMED) 0,86% y persulfato amónico 0,45 µg/µl. Las muestras se preparan en el *Tampón de carga 3x para proteínas* (Tabla 1) y se mantienen a 200 V durante 1 hora en *Tampón electroforesis* (Tabla 1). Los geles se tiñen o se transfieren a membrana según el ensayo. Para la tinción el gel se fija y se tiñe al mismo tiempo con *Solución colorante Coomassie* (Tabla 1), durante 2 horas a temperatura ambiente, y se decolora con *Solución desteñido Coomassie* (Tabla 1) durante toda la noche a temperatura ambiente.

2.3.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no disociantes

Las muestras para estos geles se preparan en el *Tampón de carga 3x en geles no disociantes* (Tabla 1) y se mantienen en frío a 36 mA durante 2 horas en *Tampón electroforesis* (Tabla 1) sin SDS.

2.3.3. Transferencias de proteínas a membrana y detección

Las proteínas separadas mediante electroforesis (SDS-PAGE o en condiciones no disociantes) se transfieren a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) Hybond™-P (GE-Healthcare, Reino Unido), mediante el empleo de un sistema de transferencia húmedo de Bio Rad. La membrana de PVDF se activa, previo al contacto con el gel, y para ello se sumerge en metanol absoluto durante 30 s y 3 min en agua bidestilada. A continuación se humedece en *Tampón transferencia* (Tabla 1) el gel de electroforesis, la membrana activada y varios papeles absorbentes Munktell (GE-Healthcare, Reino Unido) y se monta el sistema. La transferencia se desarrolla en frío durante 1 hora a voltaje constante de 100 V.

Una vez que las proteínas se han transferido correctamente, la membrana se bloquea, durante 1 hora con PBS y leche desnatada en polvo al 5%. Las concentraciones y tipo de anticuerpos utilizados se encuentran detallados en las Tablas 4 y 5. Los anticuerpos policlonales o monoclonales diluidos en *Solución incubación* (Tabla 1), se incuban con la membrana toda la noche a 4°C, o durante 1 hora a temperatura ambiente respectivamente. Se utiliza PBS y Tween-20 al 0,05% para realizar los lavados y para cambiar de un anticuerpo a otro, o revelar. El revelado se realiza de dos formas diferentes en función del anticuerpo secundario que se use: (i) con fosfatasa alcalina (ALP), se añade *Solución NBT* 30 mg/ml y la *Solución BCIP* 15 mg/ml, diluidos 1/100 en *Tampón AP* (Tabla 1); (ii) con peroxidasa del rábano (HRP), se emplea un sistema de quimioluminiscencia en el que la emisión de la luz es captada en una placa de rayos X. Si es necesario se realizan tinciones reversibles de las membranas con *Solución colorante Rojo Ponceau* y se decolora con PBS. Las tinciones irreversibles se realizan con *Solución colorante y de desteñido Fast-Green* (Tabla 1).

2.3.4. Expresión y purificación de PABP recombinante

Inducción de la proteína recombinantes con IPTG

Las bacterias *E. coli* de la cepa M15[pREP4] se transforman con la construcción pQe30-LiPABP, cuyo producto de expresión se transcribe bajo el control del promotor T5/*lac*. La inducción con IPTG desplaza al represor codificado por pREP4 del operador *lac*, en ese momento la T5 ARN polimerasa es capaz de llevar a cabo la transcripción y se desarrolla la expresión de la proteína de interés.

Una colonia de bacterias que ha introducido el plásmido con el inserto, se crece en medio LB en presencia de Amp 50 µg/ml y Kan 25 µg/ml durante 16 horas a 37°C en agitación. Al día siguiente un volumen de 3,3 ml del preinoculo se añade a 200 ml de medio LB con la misma concentración de antibióticos, durante 2 horas a 37°C en agitación. Para comprobar que la densidad de crecimiento bacteriano es apropiada para el siguiente paso se mide la D.O. a una longitud de onda de 595 nm, considerando crecimiento óptimo cuando se obtienen valores entre 0,3-0,5 de absorbancia. La inducción de la proteína se realiza completando con 2 mM de IPTG (Sigma-Aldrich,

EEUU) y se mantiene el cultivo durante 4 horas en agitación a 37°C. Terminada la incubación las células se centrifugan durante 10 min a 3000 x g a 4°C, se lavan con PBS, y se guardan a -80°C. Para confirmar la expresión y determinar la solubilidad de la proteína, se recogen muestras sin inducir e inducidas.

Determinación de la solubilidad

En determinadas condiciones se pueden producir agregados de proteína inactiva en la célula, denominados cuerpos de inclusión. Son frecuentes en bacterias recombinantes que producen proteínas heterólogas bajo el control de promotores fuertes, y por tanto representan un problema importante en procesos biotecnológicos destinados a la producción de proteínas. Para obtener las fracciones soluble e insoluble de las bacterias tratadas con IPTG, las células se resuspenden en *Tampón de lisis S* (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8; NaCl 300 mM e imidazol 10 mM) y se procede al lisado mediante sonicación en 10 ciclos con pulsos de 10 s a máxima amplitud. El homogeneizado resultante se centrifuga a 12000 x g a 4°C durante 15 min para separar el extracto soluble del insoluble. Los resultados de la electroforesis SDS-PAGE del lisado total bacteriano y de las fracciones obtenidas mostraron que la proteína LiPABP se expresaba de forma insoluble dentro de cuerpos de inclusión (Figura 9A).

2.3.5. Purificación de la proteína recombinante

Obtención de extracto soluble en condiciones desnaturalizantes

Para la solubilización de la proteína recombinante se utiliza urea como agente caotrópico. Las bacterias *E. coli* M15[pREP4] inducidas con IPTG y que contienen el plásmido pQe30-LiPABP se resuspenden en 4 ml de *Tampón unión-urea* (Tabla 7) y se lisan con sonicación durante 10 ciclos de 10 s a máxima amplitud. El sobrenadante de cada muestra se recoge después de centrifugar el lisado bacteriano a 12000 x g a 4°C durante 15 min.

Tabla 7. Tampones utilizados en la purificación de la proteína recombinante.

Nombre	Composición
Tampón unión-urea	Tris-HCl 20 mM, pH 7,8; NaCl 500 mM; imidazol 5 mM y urea 8 M
Tampón lavado	Tris-HCl 20 mM, pH 7,8; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM y urea 8 M
Tampón unión sin urea	Tris-HCl 20 mM, pH 7,8; NaCl 500 mM e imidazol 5 mM
Tampón elución	Tris-HCl 20 mM, pH 7,8; NaCl 500 mM; e imidazol 300 mM

Cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes

La proteína LiPABP, se purifica bajo condiciones desnaturalizantes mediante la interacción con la resina con níquel Ni-NTA del sistema *QIAexpressionist*[™] (Qiagen, Alemania), para posteriormente ser eluida con imidazol dada la afinidad del mismo por la His, esta metodología se conoce como cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados. Se utilizan 4 ml de resina diluida en *Tampón unión-urea* (Tabla 7) y se empaqueta en una columna de 10 mm x 10 cm. A continuación se equilibra con el mismo tampón a un flujo constante de 20 ml/hora con una bomba peristáltica. El sobrenadante de la lisis bacteriana de 200 ml de cultivo se diluye hasta un volumen de 10 ml con *Tampón unión-urea* y se añade a la columna. Para eliminar las proteínas que no se han unido a la resina se procede a lavar la columna con 10 ml de *Tampón lavado* (Tabla 7), y se aplican 40 ml de un gradiente que disminuye lentamente la concentración de urea (8M-0M), de esta forma se inicia una renaturalización lenta de la proteína en la columna. Con 10 ml de *Tampón unión sin urea* (Tabla 7), se procede a lavar una vez más la columna. Finalmente, para liberar la proteína de la resina se adiciona 10 ml de *Tampón elución* (Tabla 7). El eluyente se monitoriza con un detector de onda variable ultravioleta LKB Brohma a 280 nm. Se recogen eluyentes de 6 ml y se realiza una electroforesis SDS-PAGE al 12% de las distintas fracciones. Las fracciones donde aparece la proteína recombinante se detectan mediante tinción con *Solución colorante Coomassie* (Tabla 1) se reúnen y se concentran mediante filtros en columnas Centricón C30[®] (Figura 9B). La cuantificación de la proteína recombinante purificada, se realiza por el método Bradford.

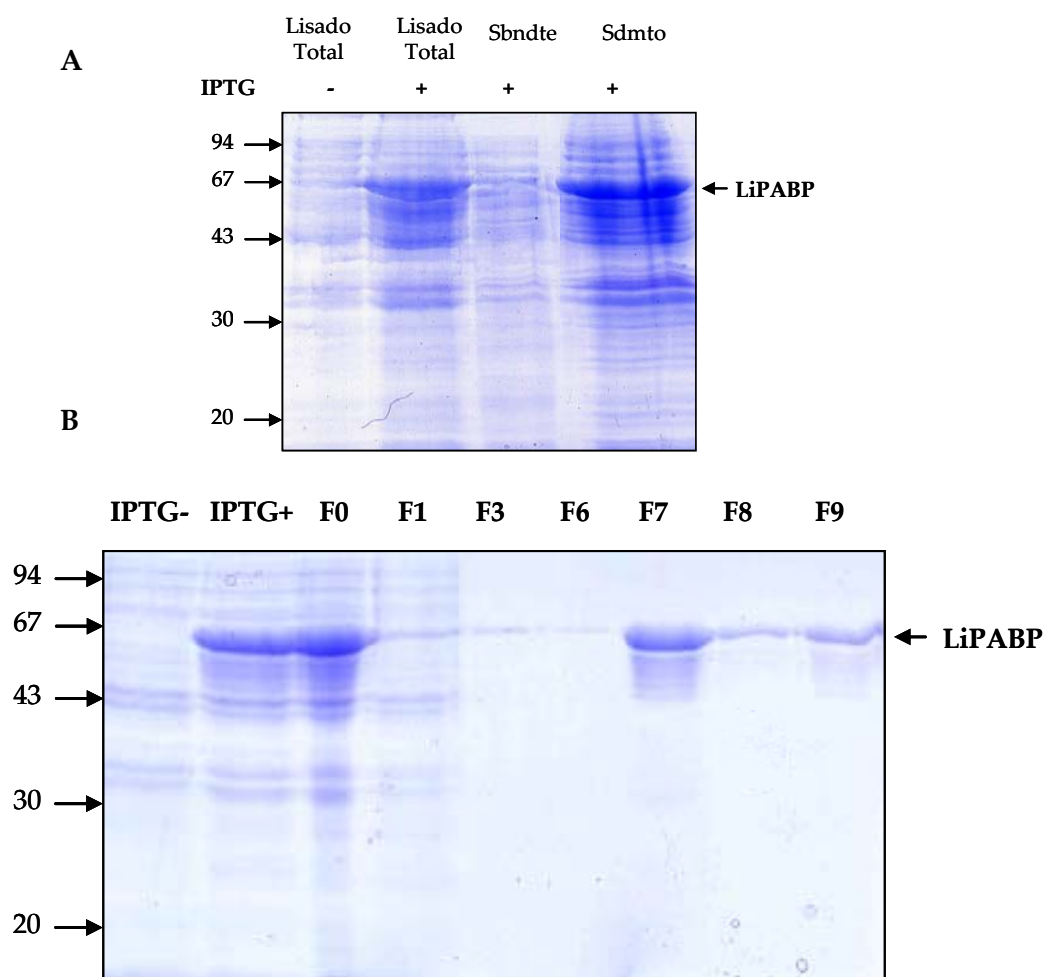


Figura 9. Muestras obtenidas en el proceso de purificación de la proteína LiPABP. (A) SDS-PAGE al 12% donde se observa expresión de la proteína correspondiente a LiPABP tras la inducción con IPTG en el lisado total, así mismo se observa la presencia de proteína en el sedimento (Sdmto) y no en el sobrenadante (Sbdte), indicando que nuestra proteína es insoluble y se encuentra formando cuerpos de inclusión. (B) SDS-PAGE al 12% de las fracciones de purificación bajo condiciones nativas, se observa proteína tras la inducción con IPTG y en la fracción obtenida tras la sonicación (F0), así como en las fracciones obtenidas tras la adición al sistema del *Tampón de elución* (F7, F8, F9). En las fracciones recogidas tras aplicar la muestra a la columna (F1), con *Tampón de lavado* (F3) o durante en gradiente de urea (F6) no se observa banda o es muy ligera, debido a que durante la recolección de estas fracciones la proteína está retenida en la resina de níquel de la columna.

2.4. Ensayos de caracterización de proteína

2.4.1. Cromatografía de afinidad en suspensión

Los estudios de unión y afinidad a una secuencia de adeninas de la proteína LiPABP, se han realizado mediante purificación de la proteína con resina sefarosa

conjugada a cadenas de poli(A). Para el acoplamiento de las adeninas, 1 ml de resina CNBr-sefarosa se incubaba con 30 mg de poli(A) comercial (Tabla 3) (disuelta en Tris-HCl 20 mM; pH 6,8), en 5 ml de *Tampón-acoplamiento* (Tabla 8) durante una noche a 4°C. Al día siguiente se lava el exceso de ligando, con al menos 5 volúmenes de *Tampón-acoplamiento* y se bloquean los grupos activos libres con Tris-HCl 100 mM; pH 8, durante 2 horas a 4°C. Finalmente la resina conjugada con poli(A) se lava, con al menos 3 ciclos de pH alternativos, con 5 volúmenes de *Tampón-ácido* y *Tampón-básico* (Tabla 8).

Tabla 8. Tampones utilizados en la unión a poli(A)-sefarosa.

Nombre	Composición
Tampón-acoplamiento	NaHCO ₃ 100 mM, pH 8,3; NaCl 500 mM
Tampón-ácido	Ácido acético 100 mM pH 4; NaCl 500 mM
Tampón-básico	Tris-HCl 100 mM, pH 8; NaCl 500 mM
Tampón unión sefarosa	Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; DTT 1mM; MgCl ₂ 1 mM; EDTA 5mM; PMSF 1mM

Para analizar la unión de PABP o LiPABP a Poli(A)-sefarosa, lisados de células HEK293T (50 µg), lisados de células sobreexpresando LiPABP (25-50 µg) o lisados de *L. infantum* (100 µg), se incubaron con 50 µl de poli(A)-sefarosa al 50 %, en presencia o ausencia de 25 µg de Poli(A), en un volumen final de 200 µl de *Tampón unión sefarosa* durante 1 hora a 4°C en agitación. Tras la incubación la resina se lava tres veces con *Tampón unión sefarosa* a 4°C. Las proteínas se eluyen en *Tampón de carga* 3x (Tabla 1) y se resuelven mediante SDS-PAGE y transferencia. La inmunodetección se realiza con el uso de anticuerpos frente a PABP eucariota, Flag o c-Myc, o con sueros policlonales de perro infectados con LV canina.

2.4.2. Ensayos de fosforilación

Los ensayos quinasa para estudiar la fosforilación de LiPABP se realizan mediante la incubación en *Tampón-quinasa* (Tris-HCl 20 mM, pH 6,8; MgCl₂ 2 mM; KCl 50 mM), de 2 µg de la proteína recombinante, ATP 30 µM (frío), 3 µCi de [γ^{32} P]ATP y en presencia de 6,25 ng de la quinasa p38 recombinante (Upstate, EEUU), durante 15

minutos a 30°C. La proteína básica de la mielina MBP, se utiliza como control de la fosforilación al ser sustrato específico de la quinasa p38. La reacción se neutraliza con *Tampón de carga 3x* (Tabla 1), se carga todo el contenido de la reacción en un gel de electroforesis y se tiñe con *Solución colorante Coomassie* (Tabla 1). Finalmente, el gel se expone en placas sensibles que son leídas en un sistema *Typhoon* de análisis de radiactividad y en placas de autorradiografía.

2.4.3. Valoración de la antigenicidad mediante inmunoensayo. E.L.I.S.A

Para determinar la reactividad frente a LiPABP de sueros de perros infectados con *L. infantum*, la proteína recombinante LiPABP a una concentración de 200 ng en PBS 1x, se ha dispuesto en placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca) durante una noche a 4°C. Tras este periodo, el exceso de antígeno no fijado es arrastrado mediante tres lavados con *Solución PBS-Tween-0,05%* (Tabla 1). Para evitar adsorciones inespecíficas de las inmunoglobulinas del suero, se depositan 200 µl de leche desnatada al 5% en *Solución PBS-Tween-0,05%*, y se incuban las placas a temperatura ambiente, durante 1 hora. Nuevamente para eliminar los restos de la solución de bloqueo se realizan tres lavados con *Solución PBS-Tween-0,05%*. El suero de cada muestra se añade en cada pocillo a una dilución 1/200 en 100 µl de leche desnatada al 5% en *Solución PBS-Tween-0,05%*, y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. De nuevo, se realizan tres lavados con *Solución PBS-Tween-0,05%* y se incuba con anticuerpo anti-IgG de perro marcado con peroxidasa durante 1 hora a temperatura ambiente, seguidamente el exceso de anticuerpo se elimina con cuatro lavados. Para el revelado de la placa se añade 100 µl/pocillo de la solución sustrato que contiene OPD (ortofenilendiamina) (Sigma-Aldrich, EEUU) y 0,6% de H₂O₂. La parada de la reacción se realiza con H₂SO₄ 1M y se procede a la lectura de la placa en varios tiempos en un espectrofotómetro SPECTRA FLUOR (TECAN) a una $\lambda = 492$ nm.

2.5. Proceso SELEX

2.5.1. Selección in vitro

Para iniciar las rondas de selección, se utiliza la librería de nucleótidos denominada RND40 (Tabla 3), formada por secuencias diferentes de 40 nucleótidos en disposición aleatoria y flanqueada por dos regiones conocidas de 18 nucleótidos. Se

desnaturaliza una concentración de 2 nmol de la librería, durante 10 min a 95°C en un volumen de 200 µl de *Tampón-aptámero* (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; MgCl₂ 2 mM; KCl 5 mM, y BSA 0,2%), y se mantiene a 4°C durante 10 min para promover la formación de las estructuras terciarias de la hebra de ADN. Se adicionan 2 µg de la proteína diana LiPABP que contiene fusionada una cola de 6 His, y se incuban durante 30 min a 37°C en agitación. Para la purificación de los complejos aptámero-proteína se añade a la mezcla 20 µl de resina Ni-NTA agarosa en un volumen final de 200 µl en *Tampón-aptámero*, durante 1 hora en agitación, se realizan 3 lavados con 1 ml del mismo tampón y los complejos PABP:aptámero se resuspende finalmente en 20 µl de agua destilada. Las secuencias de ADN monocatenarias retenidas en la resina, se amplifican mediante PCR con los cebadores denominados F3 5' y R3 3' (Tabla 2) a 1 µM cada uno, dNTPs a 250 µM, 2 mM de MgCl₂ y 1,25 U de Taq Polimerasa, en un volumen final de 50 µl.

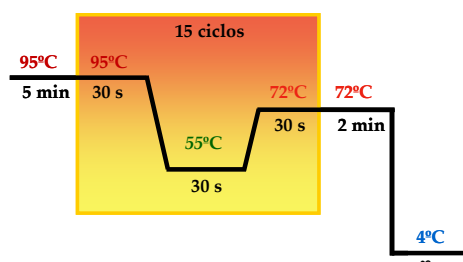


Figura 10. Programa de PCR de amplificación de aptámeros.

Para continuar la selección-amplificación en la ronda siguiente se utiliza una concentración de 5 µM (25 µg) del producto de PCR de la ronda preliminar en vez de la librería RND40, y se continúa todo el proceso descrito de la misma forma durante varias rondas.

Marcaje de aptámeros

Los aptámeros se marcan en sus extremos mediante PCR y utilizando los cebadores F3-dig 5', R3-dig 3' y F3-bio 5' (Tabla 2).

Precipitación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos resultantes de cada amplificación se precipitan con 0,1 v/v de acetato sódico 3 M y 2,5 v/v de etanol absoluto frío durante 1 hora a -80°C, o durante una noche a -20°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifuga a 12000 x g durante 15 min y se lava con 100 µl de etanol 75% el sedimento obtenido. Se realiza otra centrifugación en las mismas condiciones y se eliminan completamente los restos de etanol a temperatura ambiente. Para finalizar, se resuspende en 25 µl de agua destilada y se cuantifica en el Nanodrop.

Electroforesis en geles de agarosa

Para comprobar si la amplificación del aptámero se ha efectuado correctamente se realizan electroforesis en geles de agarosa de 2,5% y con el marcador de peso molecular pUC19/ *MspI* (*HpaI*), de la misma forma descrita en el apartado 2.2.4.

2.5.2. Clonaje de los aptámeros

Con la finalidad de obtener aptámeros individuales se procede a clonar la población de aptámeros en el plásmido pGEM®-T (Promega, EEUU). La reacción de ligación se optimiza a una relación molar 1:1 (ADN:vector) en un volumen de reacción 10 µl, con 3 U de la enzima T4 ADN ligasa, en tampón T4 ADN ligasa. La incubación se realiza a temperatura ambiente durante 1 hora, o bien toda la noche a 4°C. La mezcla de ligación se utiliza para transformar *E. coli* competentes (apartado 2.1.2) y las colonias son analizadas mediante PCR, para identificar los clones positivos y proceder al aislamiento del aptámero.

2.5.3. Transferencia de proteínas por difusión Slot Blot

El Slot Blot o transferencia por ranuras, es un método rápido y eficaz para estimar la concentración de fragmentos de ADN, de moléculas de ARN o proteína, presentes en una muestra. Se utiliza un soporte acrílico conectado a una bomba de vacío con orificios en forma de ranura a través de los cuales se añade la muestra. En todos los ensayos realizados las concentraciones crecientes (47-378 fmol) de la proteína diana recombinante LiPABP y 378 fmol de BSA, se transfieren mediante un sistema de vacío

Hoefer PR 600 (Hoefer Scientific Instruments, EEUU) a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™-ECL™, Amersham Biosciences, Reino Unido), humedecida en PBS. Una vez que se inmoviliza la proteína en el filtro, se lavan 3 veces los pocillos del sistema con PBS y se extrae la membrana del soporte.

2.5.4.Detección con aptámeros

La membrana de nitrocelulosa obtenida en el Slot Blot, se incuba durante 1 hora en PBS y 5% de leche desnatada a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de leche se realizan tres lavados de 10 min, siendo los dos primeros en PBS y el último en *Tampón-aptámero*. Los aptámeros, marcados con digoxigenina y diluidos en *Tampón-aptámero* a las distintas concentraciones, se calientan 10 min a 95°C, se mantienen a 4°C durante 10 min y se incuban con la membrana del Slot Blot durante 1 hora a 37°C en agitación. Para eliminar el exceso de oligonucleótido no unido, se realizan tres lavados en *Tampón-aptámero*. La determinación de la unión ADN-proteína se realiza con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con peroxidasa (Tabla 5) en *Tampón-aptámero* y un sistema de quimioluminiscencia que emite luz y es captada en una placa de rayos X. La cuantificación de las bandas se realiza en un analizador de imágenes equipado con el programa Image Quant™. Los datos se obtienen en unidades de densidad óptica/mm².

2.5.5.Inmunoensayo enzimático en placa con aptámeros

La técnica E.L.O.N.A (Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay) es un ensayo cuantitativo basado en la interacción antígeno-oligonucleótido en el que se utilizan conjugados, consistentes en anticuerpos o antígenos ligados a una enzima, cuya actividad es capaz de generar productos detectables por colorimetría o fluorescencia. Según el objetivo planteado y la información que se desea obtener se realizan distintas combinaciones de aptámeros o proteínas, manteniendo el mismo protocolo de actuación.

Para estudiar los límites de detección que poseen la población de aptámeros y los aptámeros individuales, se dispone en placa de 96 pocillos una única concentración de

la proteína LiPABP y de la misma concentración de BSA, que se utiliza como control negativo de interacción aptámero-proteína. Para examinar cual es la concentración mínima de proteína que es posible ser detectada bien por el conjunto de aptámeros, o bien por un aptámero individualizado, se depositan en las placas concentraciones crecientes de proteína recombinante LiPABP y una concentración de BSA igual a la máxima concentración utilizada de la proteína problema. En los ensayos de especificidad de unión de los aptámeros, se dispone en placa de una única concentración de diferentes proteínas recombinantes de *L. infantum*, y eucariotas. Todas las proteínas de las diferentes opciones se diluyen en 200 µl de *Tampón-aptámero* y se incuban a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se procede a lavar cuatro veces los pocillos con *Tampón-aptámero* para eliminar el exceso de proteína no unido a la placa. En función del ensayo planteado, se incuba la proteína dispuesta en placa durante 1 hora a 37°C, con las distintas concentraciones de los oligonucleótidos que se analizan, en un volumen final de 200 µl de *Tampón-aptámero*. Todas los oligonucleótidos utilizados se marcan con digoxigenina y se encuentran previamente desnaturalizados tras el tratamiento de 10 min a 95°C y su posterior mantenimiento a 4°C durante 10 min. Transcurrido el periodo de incubación el exceso de ADN no unido se elimina con cuatro lavados con *Tampón-aptámero*. Para detectar la unión del oligonucleótido a la proteína se incuba con 200 µl de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa en *Tampón-aptámero* durante 1 hora a 37°C en agitación. Para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizan cuatro lavados de 10 min cada uno con *Tampón-aptámero*. Para el revelado de la placa se añade 100 µl/pocillo de solución ABTS (Boehringer-Mannheim) y transcurridos 10 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se procede a la lectura de la placa en varios tiempos en un espectrofotómetro SPECTRA FLUOR (TECAN) a una $\lambda = 405$ nm.

2.5.6. Purificación con aptámeros.

Para analizar la capacidad de los aptámeros de retener con alta afinidad a la proteína LiPABP presente en lisados, se han realizado ensayos de purificación con resina. La matriz utilizada contiene micropartículas magnéticas con estreptavidina que se equilibran en agitación 30 min a 4°C en *Tampón Lisis A* (Tabla 1), y se añade 1 mg/ml

de Citocromo C (Sigma) para bloquear la unión inespecífica. Mientras por otro lado, se incuban los diferentes lisados celulares (55 µg) con los correspondientes ácidos nucleicos (125 pmol), marcados con biotina mediante PCR (Tabla 2), durante 30 min a 4°C. Para llevar a cabo la purificación se añaden a la mezcla de las muestras de lisados y aptámeros biotinilados, 30 µl de micropartículas con estreptavidina diluidas al 50%, durante 2 horas a 4°C en agitación. Tras la incubación con la matriz, las muestras de todos los ensayos se centrifugan 5 min 3500 x g a 4°C y se lavan los precipitados tres veces con *Tampón-resina* a 4°C. Las proteínas retenidas se eluyen en *Tampón de carga 3x* (Tabla 1) y se resuelven mediante SDS-PAGE y transferencia. La detección de las diferentes proteínas se realiza con el uso de anticuerpos frente a Flag y suero policlonal de perros infectados.

2.6. Análisis estadístico

Los datos son presentados como el valor de la Media \pm S.E.M de tres a seis medidas independientes en experimentos separados y analizados mediante GraphPad Prism v4 (San Diego, USA). Los diferentes análisis estadísticos utilizados se indican en el texto y en las leyendas de las figuras.



RESULTADOS Y DISCUSION

*No debemos dejar de explorar.
Y al final de nuestras exploraciones
llegaremos al lugar del que partimos,
y lo conoceremos por primera vez*

Thomas Stearns Eliot

1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN AL POLI (A) DE *L. infantum*, LiPABP

1.1. Historia evolutiva e identificación de dominios conservados de la proteína LiPABP

La proteína de *Leishmania* con homología con la proteína de unión a poli(A) de otros eucariotas, identificada mediante herramientas bioinformáticas y codificada por una secuencia de ADN rescatada a partir del genoma de *L. infantum*, tiene 585 aminoácidos y la hemos denominado LiPABP. Esta proteína presenta carácter básico, con un punto isoelectrico de ~9.14, y una masa molecular teórica de 65 kDa. Este tamaño se corresponde con el rango de tamaños, 62-73 kDa, de las PABPs descritas en otros organismos (Nietfeld y col., 1990; Batista y col., 1994). Las PABPs han sido identificadas y caracterizadas estructural y funcionalmente en muchos eucariotas, pero parecen estar ausentes en organismos procariotas. Estos genes de PABPs han sido clonados y su secuencia esta disponible en varias bases de datos.

Con el alineamiento de secuencia de proteínas de diferentes organismos (Tabla 9) y mediante la construcción de un árbol de filogenia (Figura 11), hemos analizado la homología de LiPABP y las proteínas de unión a poli(A) de tripanosomátidos y otros eucariotas. Los cálculos matemáticos revelan que LiPABP es casi idéntica a la PABP de *L. braziliensis* con un 94% de identidad, disminuye en semejanza con la de *T. cruzi* y *T. brucei* con un ~70% de identidad, y sólo comparte un 33% de identidad con la de *L. major*. Fuera del grupo de los kinetoplástidos la secuencia de LiPABP en *L. infantum* es más homóloga a la secuencia de *D. rerio* o pez cebra, con una identidad del 37%. Frente al resto de eucariotas comparados, los porcentajes de identidad se sitúan entre un 28-35%.

En la historia evolutiva de las proteínas PABPs se observa como, en una misma rama del árbol filogenético, están agrupadas la mayoría de las PABPs descritas pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Dentro del grupo, se diferencian dos sub-nodos, uno formado por especies del género *Trypanosoma* y, otro, por especies del género *Leishmania*. Analizando los datos de homología, se observa que la proteína

Resultados y Discusión

LiPABP de *L. infantum* presenta una relación más cercana con *L. braziliensis*, y muestra más correspondencia evolutiva con *T. brucei* (TbPABPI) y *T. cruzi* (TcPABP), también tripanosomátidos pero de distinto género, que con *L. major* (LmPABP1), especie del mismo grupo, pero que se encuentra en otra rama del árbol, separada de este nodo de tripanosomátidos.

Proteína	Organismo	aa	% Identidad
PABP	<i>Aedes aegypti</i> (A. aegypti)	628	34
PAB5	<i>Arabidopsis thaliana</i> (A. thaliana)	668	35
PABP	<i>Babesia bovis</i> (B. bovis)	585	28
PABP	<i>Bombyx mori</i> (B. mori)	603	34
PABP1	<i>Bos taurus</i> (B. taurus)	636	34
PAB-1	<i>Caenorhabditis elegans</i> (C. elegans)	586	31
PABP1-2	<i>Canis lupus familiaris</i> (C. lupus)	636	34
PABPC1	<i>Danio rerio</i> (D. rerio)	634	37
PABPA	<i>Drosophila melanogaster</i> (D. melanogaster)	634	35
PABP1	<i>Equus caballus</i> (E. caballus)	591	31
PABPC1	<i>Gallus gallus</i> (G. gallus)	637	34
PABPC1	<i>Homo sapiens</i> (H. sapiens)	636	34
PABP	<i>Leishmania braziliensis</i> (L. braziliensis)	579	94
PABP1	<i>Leishmania major</i> (L. major)	560	33
PABPC1	<i>Mus musculus</i> (M. musculus)	636	34
PABPC1	<i>Pan troglodytes</i> (P. troglodytes)	614	34
PABP	<i>Plasmodium falciparum</i> (P. falciparum)	875	32
PAB1P	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (S. cerevisiae)	577	31
PABP	<i>Schistosoma mansoni</i> (S. mansoni)	688	34
PABPC1	<i>Taeniopygia guttata</i> (T. guttata)	637	33
PABP	<i>Tribolium castaneum</i> (T. castaneum)	565	30
PABPI	<i>Trypanosoma brucei</i> (T. brucei)	555	69
PABP	<i>Trypanosoma cruzi</i> (T. cruzi)	550	70
PABP1-A	<i>Xenopus laevis</i> (X. laevis)	633	35

Tabla 9. Proteínas de unión a poli(A) de diferentes organismos. Se muestra el tamaño de varias proteínas PABP homólogas entre si, y el porcentaje de identidad respecto a LiPABP calculado con el programa CLUSTALW2. Los números de acceso de cada secuencia están recopilados del NCBI y se muestran en la Tabla 6 en el apartado *Material y Métodos*. PABP, proteína de unión a poli(A); PABPC, proteína citoplasmática de unión a poli(A); los números o letras indican isoformas en cada organismo; aa, aminoácidos.

La primera PABP que se describe en la familia *Trypanosomatidae* es la proteína TcPABP en *T. cruzi* (Batista y col., 1994) y, aunque no existen muchos trabajos de estas proteínas en este grupo de parásitos, actualmente ya se han caracterizado PABPs en *T. brucei* (Hotchkiss y col., 1999), *L. major* (Bates y col., 2000) y *L. amazonensis* (Silva Junior y col., 2002). La proteína TcPABP tiene un peso molecular de 66 kDa y presenta un

88,7% de identidad con TbPABP1 de *T. brucei* de 62 kDa. Estas dos proteínas presentan un 40% de homología con las proteínas de otros organismos y muestran conservación en los dominios de unión a ARN (llamados RRM a lo largo de toda la tesis) del extremo N-terminal (Hotchkiss y col., 1999). Por otra parte, la proteína PABP de *L. major* (LmPABP1), de 62 kDa, muestra un menor parentesco con otras PABPs de tripanosomátidos ya que su dominio RRM IV es mas divergente (Bates y col., 2000). La proteína de *L. amazonensis* tiene 18 kDa y, aunque sólo presenta 2 RRM y el segundo dominio está incompleto, se considera una proteína funcional pero con menos afección por el ARN (Silva Junior y col., 2002). Ante estos datos deducimos que la proteína LiPABP está relacionada filogenéticamente con proteínas de unión a poli(A) de tripanosomátidos y de otros eucariotas superiores.

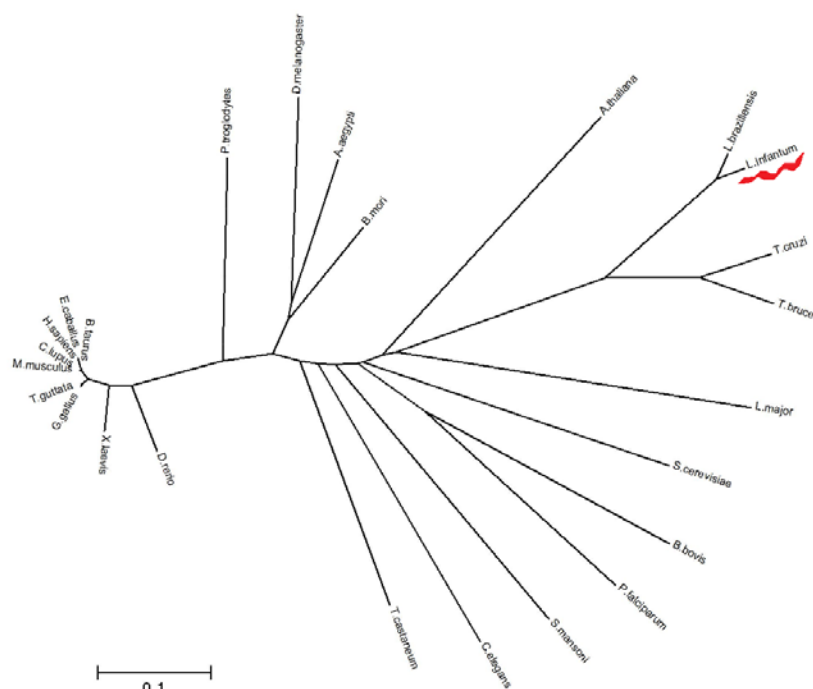


Figura 11. Relaciones evolutivas de las proteínas de unión a poli(A) (PABPs). El árbol de filogenia radial no enraizado se ha construido con el programa MEGA4, mediante el método de distancias de unión al vecino (*neighbor-joining*). La barra de escala indica 0,1 sustituciones por sitio. Las secuencias seleccionadas se han extraído de la base de datos del NCBI (Tabla 6, apartado *Material y Métodos*) en formato FASTA.

1.2. LiPABP conserva los mismos dominios que PABPs de otros organismos.

El análisis de las secuencias de PABPs de algunos organismos eucariotas representativos y LiPABP (Figura 12), muestra la presencia de dominios característicos de proteínas de unión a ácido nucleico, como son los cuatro motivos RRM y el dominio único de proteínas de unión a poli(A), PABC, que se distribuyen en la cadena de la proteína de *L. infantum* entre las posiciones 9-81 (RRM I); 96-169 (RRM II); 184-263 (RRM III); 287-364 (RRM IV) y 509-579 (PABC).

Resultados y Discusión

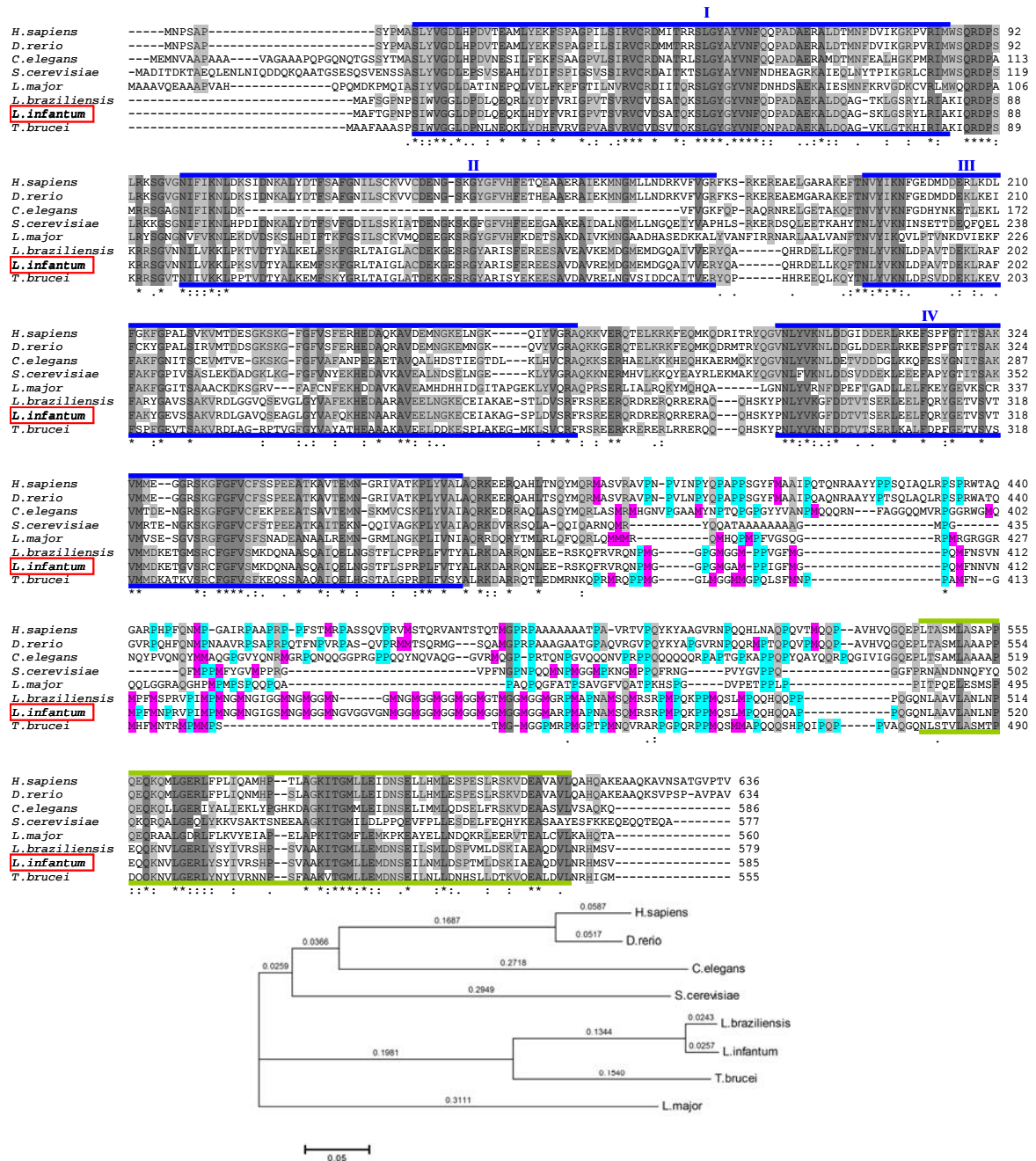


Figura 12. Alineamiento de LiPABP con PABPs homólogos representativas de tripanosomátidos y eucariotas superiores. La comparación múltiple de secuencias de proteína del panel superior se realizó con el programa CLUSTALW2. El signo (*) indica residuos conservados en todas las secuencias; (:) indica que las sustituciones de residuos están conservadas; (.) que la sustitución es semiconservada. En gris oscuro se muestran los aminoácidos idénticos en el 90-100% de las secuencias, y en gris claro, los aminoácidos idénticos que se encuentran entre un 50-90% de las secuencias. Las regiones enmarcadas en líneas azules corresponden a los cuatro motivos de unión a ARN (RRM, I-IV) del extremo N-terminal, definidos por el programa SMART en cada secuencia, y la señalada en línea amarillo-verdoso, es la región conservada correspondiente al dominio único de proteínas PABP o PABC, en el extremo C-terminal. En la zona que une los extremos N-terminal y C-terminal se han sombreado los residuos de prolina en azul brillante y los de metionina en rosa brillante. En la parte inferior se muestra el filograma con las distancias genéticas de cada organismo realizado en el programa MEGA4. La barra de escala indica 0,05 sustituciones por sitio.

En general, podemos decir que los dominios RRM no están sólo presentes en PABPs sino también en otras proteínas relacionadas con biosíntesis y procesamiento del ARNm (Routsias y col., 2010; Law y col., 2006; Rao y col., 2006). Las bases de datos de dominios SMART indican que existen 14432 dominios RRM en 8767 proteínas diferentes (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00076>). Mediante la construcción de un árbol filogenético con 73 dominios de unión a ARN de 35 proteínas diferentes (PABPs, factores de *splicing*, ribonucleoproteínas de cloroplastos, hnRNPs, snRNP UI-70K, nucleolina y factores determinantes del sexo en *Drosophila* (Sxl)), se ha establecido que todas las proteínas analizadas, tanto nucleares como citoplasmáticas, tienen un ancestro común originado en etapas tempranas de la evolución biológica, y que las estructuras repetidas de los dominios de unión se han formado por sucesivas duplicaciones de este gen ancestral (Fukami-Kobayashi y col., 1993). La conservación de estos motivos en toda la evolución y la presencia de los mismos en LiPABP, revela la gran importancia que puede tener esta proteína en la biología del ARN del parásito.

Además de los dominios RRM, las PABPs presentan una zona, localizada entre la región del extremo N-terminal que incluye los RRM y la región altamente conservada del extremo C-terminal PABC, que a pesar de no estar muy conservada entre las PABPs descritas, contiene una proporción más o menos constante de residuos de prolina (15-19%). En LiPABP esta región, que se encuentra comprendida entre los aminoácidos 387-508, contiene sólo un 10% de prolina y es rica en residuos de glicina (19%). Dentro de la familia *Trypanosomatidae* existen diferencias en esta zona. Así, mientras que en *L. major* contiene un 13,2% de residuos de prolina y un 13,7% de residuos básicos (Bates y col., 2000), en *T. brucei* presenta un alto porcentaje de prolinas (23%) (Hotchkiss y col., 1999) y en *L. amazonensis* no existe esta región (Silva Junior y col., 2002).

Los datos de nuestra secuencia analizados en el programa SMART indican que el extremo C-terminal presenta un dominio PABC, homólogo al que presentan PABPs de diferentes organismos. Un total de 289 motivos PABC (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00658>) han sido identificados en 280 proteínas diferentes.

De una forma esquemática se ha representado la estructura de todos los dominios que comparten las diferentes PABPs de la familia *Trypanosomatidae* y la presente en *H. sapiens* (Figura 13).

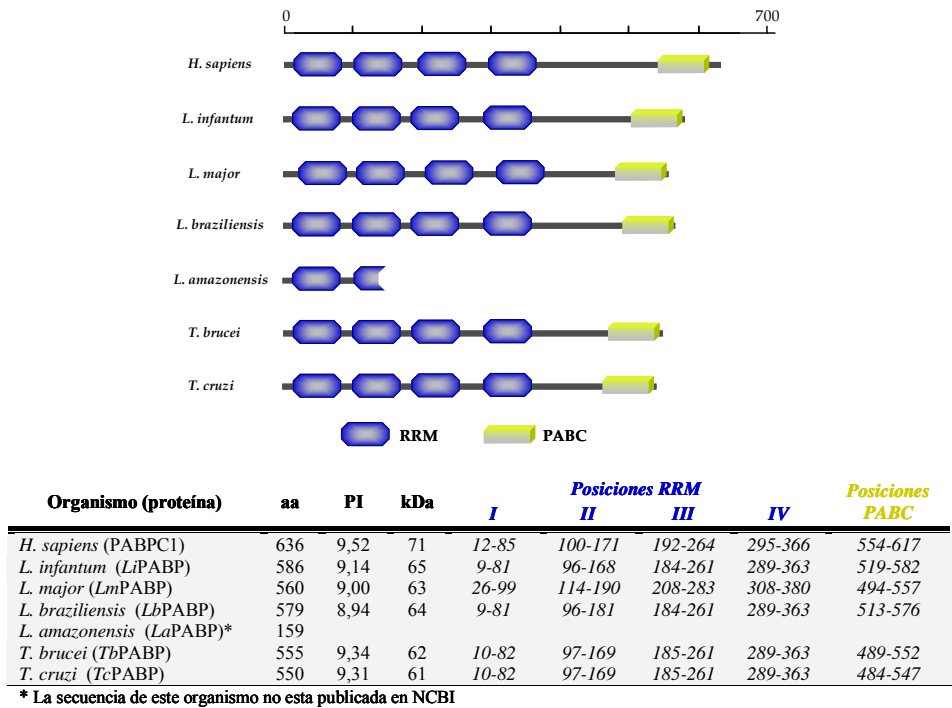


Figura 13. Mapa de dominios de LiPABP y otras PABPs. Los dominios están representados por cajas sombreadas, en azul los correspondientes a los motivos de reconocimiento de ARN o RRM (cd00590) y en amarillo-verdoso, el correspondiente al dominio único de unión a poli(A), PABC (cl02642). La secuencia de proteína de cada organismo comparado (Tabla 6, *Material y Métodos*) se introdujo en el programa SMART3, para la definición y localización de cada dominio en la cadena. Los datos del punto isoelectrico (PI) y la masa molecular en kDa se obtuvieron en el servidor EXPASSY.

Como se muestra en la Figura 13, la definición de los dominios de la secuencia rescatada del genoma de *L. infantum*, comparte número y localización de los RRM, tanto en organismos de su mismo grupo como con la proteína PABP eucariota, siendo además el tamaño y el punto isoelectrico teóricos calculados, muy similares a los de otras especies comparadas.

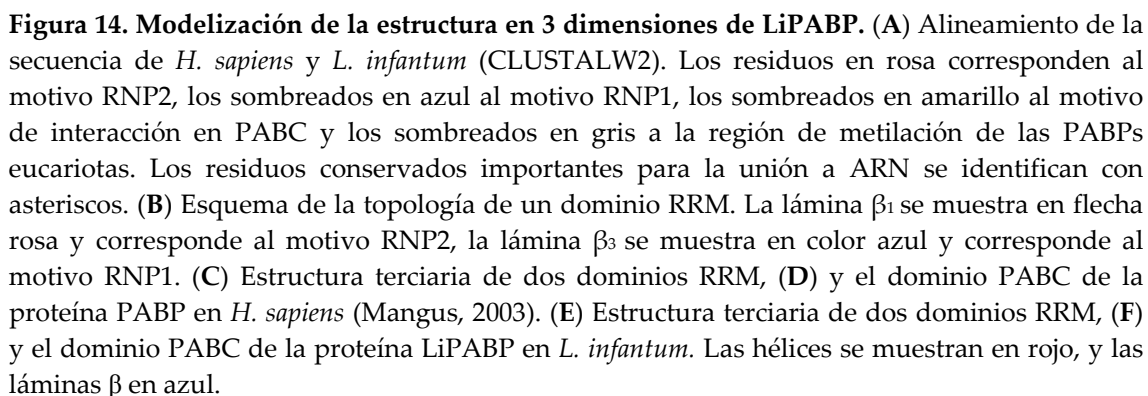
1.3. LiPABP tiene la misma estructura tridimensional que las proteínas PABPs de otros eucariotas

La localización en LiPABP de diferentes secuencias consenso en los dominios RRM, zona de unión flexible y PABC se muestra en la Figura 14A, donde se ha realizado una comparación de proteínas PABPs entre *H. sapiens* y *L. infantum*. Como se

observa en el alineamiento, LiPABP comparte la mayoría de los residuos conservados de los motivos RNP1 y RNP2, que son importantes en la unión al ARNm. Además, el motivo de interacción con proteínas KITGMLLE descrito en PABC (Kozlov y col., 2010; Kozlov y col., 2001), es completamente idéntico en los dos organismos. Sin embargo, en la proteína de *H. sapiens* existe una secuencia con alta proporción de Pro y Arg en la región flexible, implicada en la metilación por CARM (Lee y Bedford, 2002), que no aparece en LiPABP.

El plegamiento del dominio RRM en eucariotas consiste en una estructura de sándwich $\alpha\beta$ con topología $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ (Figura 14B). La estructura está compuesta por 4 láminas β antiparalelas ordenadas en el espacio como $\beta_4\beta_1\beta_3\beta_2$ y flanqueando las láminas, dos hélices, α_1 y α_2 (Figura 14C). Los cuatro residuos conservados, normalmente aromáticos, que contribuyen a la unión del ARN se encuentran accesibles en la zona expuesta del dominio. En el motivo consenso RNP1 estos residuos están en las posiciones 1, 3 y 5, y en RNP2 en la posición 2, y se localizan en la parte central de la estructura, concretamente en β_3 y β_1 (Maris y col., 2005). El dominio PABC (Figura 14D) presenta un núcleo hidrofóbico y una estructura globular compacta definida por 5 hélices α en humanos y 4 en levaduras, ordenadas en forma de flecha: la hélice α_1 en un extremo, α_2 y α_4 a los lados, la α_3 se cruza con las anteriores y constituyendo el eje de la flecha α_5 . La conservación de la secuencia es más alta en α_2 , α_3 y α_5 , que corresponden a lugares de unión a péptidos (Kozlov y col., 2001), ya que PABC no parece que interaccione con ARN (Kühn y Pieler, 1996).

Finalmente, para comprobar si LiPABP tiene una estructura terciaria similar a la descrita para estas proteínas en otros organismos (Kozlov y col., 2001; Maris y col., 2005), hemos realizado una modelización tridimensional con diferentes programas informáticos. La estructura en tres dimensiones de los dominios RRM en LiPABP (Figura 14E) presenta las dos hélices α que recubren cuatro láminas β antiparalelas, y los motivos RNP1 y RNP2 están localizados, como ocurre en otras PABPs, en las láminas β_3 y β_1 . El extremo C-terminal que contiene el dominio PABC es una estructura globular formada por 4 hélices α , similar en el número de hélices al del dominio PABC



2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LiPABP

2.1. Expresión heteróloga de LiPABP en células de mamíferos

Con la finalidad de comprobar la expresión de la proteína LiPABP en la línea celular eucariota HEK293T, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección de lisados de células transfectadas con Myc-LiPABP y Flag-LiPABP. Como se puede ver en la Figura 15, tanto el anticuerpo anti-Myc como el anti-Flag reconocen a dos proteínas sobreexpresadas en las células.

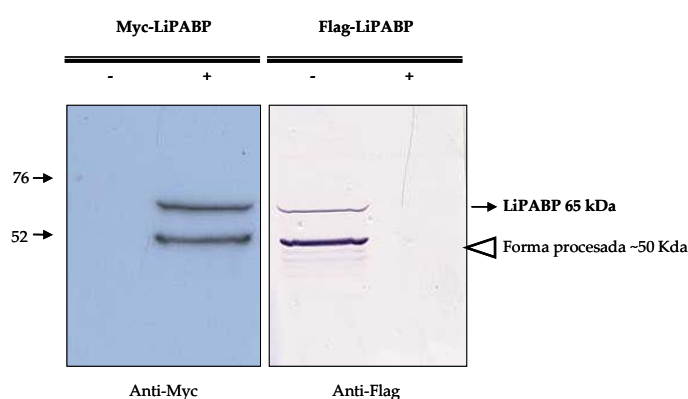


Figura 15. Expresión en una línea celular eucariota de LiPABP de *L. infantum*. Lisados de células HEK293T transfectadas con un vector sin inserto con etiqueta Myc o Flag, o con Myc-LiPABP y Flag-LiPABP, se analizaron por SDS-PAGE (12%) e inmunodetección con anticuerpos anti-Myc y anti-Flag, revelando mediante quimioluminiscencia o con fosfatasa alcalina respectivamente.

Los anticuerpos utilizados sólo pueden reconocer las proteínas de fusión que han incorporado en su extremo N-terminal la etiqueta Myc o Flag; por tanto, concluimos que las dos bandas reconocidas corresponden a LiPABP. La banda superior es de aproximadamente 70 kDa y se aproxima al peso molecular teórico, calculado mediante herramientas bioinformáticas, de 65 kDa. La banda inferior, de unos 50 kDa, mantiene intacto su extremo N-terminal y es reconocida por el anticuerpo, pero parece haber perdido aminoácidos en su extremo C-terminal (Figura 15). El tamaño de las bandas se calcula a partir de las distancias entre las proteínas del marcador de peso molecular, y deducimos que la banda inferior debe contener unos ~120 residuos menos en su extremo C-terminal. A esta banda la denominamos forma procesada de ~50 kDa.

La presencia de las dos bandas y el hecho de que se mantenga intacto el extremo N-terminal que contiene la etiqueta podría deberse a una proteólisis de LiPABP en la región C-terminal producida en esta línea celular por una proteasa endógena. Para comprobar si esta proteólisis es un efecto exclusivo en la línea celular HEK293T, se estudió la expresión en otras líneas celulares eucariotas como son MCF7 y HepG2 (Figura 16).

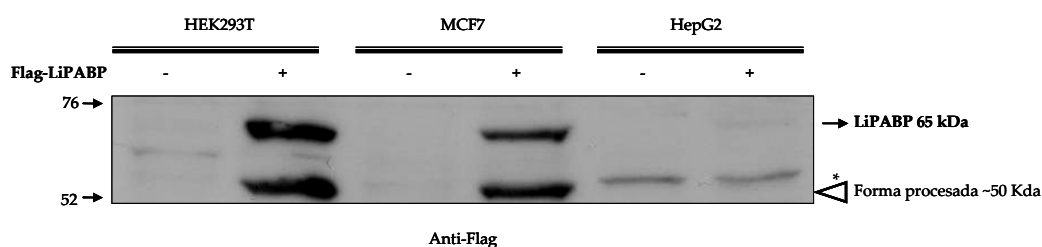


Figura 16. Expresión de LiPABP de *L. infantum* en diferentes líneas celulares eucariotas. Lisados de células eucariotas HEK293T, MCF7 y HepG2 transfectadas con un vector sin inserto con etiqueta Flag (-) y con Flag-LiPABP (+), se analizaron por SDS-PAGE (12%) e inmunodetección con anticuerpos anti-Flag. Se muestra una membrana representativa de varios experimentos realizados. El símbolo * indica una banda inespecífica en la línea celular HepG2.

La inmunodetección de la proteína en lisados de las células transfectadas con Flag-LiPABP revela tanto la proteína completa LiPABP como la forma procesada de alrededor de 50 kDa, en las líneas HEK293T y MCF7, detectándose muy baja expresión en HepG2 de las dos formas de LiPABP. Para confirmar que la aparición de esta banda de 50 kDa es producto de una modificación post-traduccional se realizó un ensayo *in vitro* en un sistema de reticulocitos de conejo, que contiene todos los elementos necesarios para la transcripción y traducción de ARNm pero carece de proteasas celulares (Figura 17).

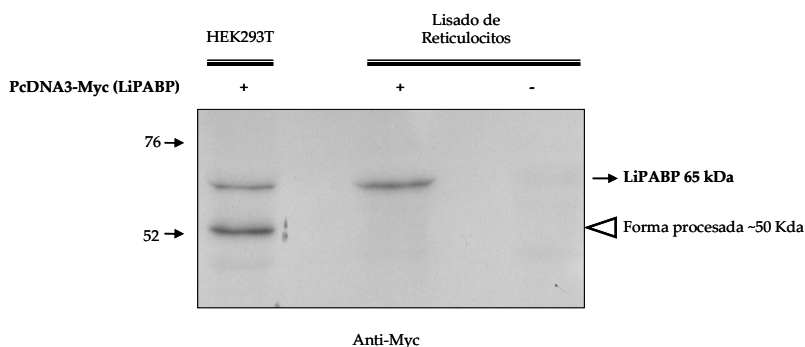


Figura 17. Expresión de LiPABP en un sistema *in vitro*. Ensayo SDS-PAGE (10%) e inmunodetección con anti-Myc, de la proteína LiPABP expresada en un sistema *in vivo* en células HEK293T y en un sistema *in vitro* de reticulocitos de conejo.

Como se observa en la Figura 17, en este sistema sólo se obtiene la proteína de 65 kDa, lo que demuestra que la aparición de la forma procesada ocurre *in vivo* probablemente debido a la presencia de proteasas.

Previamente se ha descrito la degradación de PABP en apoptosis y su susceptibilidad a ser reconocida por ciertas proteasas virales. Existen pocos datos fuera de estas condiciones, aunque sí se ha mostrado que la proteína de unión a poli(A) experimenta una proteólisis intrínseca en lisados celulares de tejido de *Drosophila* que disminuye durante el choque térmico (Lefrere y Duncan, 1994). Se ha comprobado la degradación de PABP durante la inducción de apoptosis en células HeLa, K562, Jurkat y MCF7 (Marissen y col., 2004; Zhang y col., 2007). Los inductores de apoptosis producen una inhibición de la traducción que se correlaciona con la degradación de PABP, aunque durante la incubación con caspasas no se observa hidrólisis, y solamente con la caspasa 3 se induce una débil degradación en lisados celulares en MCF7 (Marissen y col., 2004). La rotura de PABP varía dependiendo del activador de apoptosis y del tipo celular estudiado, lo que induce a pensar que una proteasa diferente en respuesta o en conjunción con caspasas, puede degradar PABP (Zhang y col., 2007).

Por otra parte, los genomas virales necesitan de la maquinaria de la célula huésped para sintetizar sus proteínas. Para traducir los ARNm, los virus deben desarrollar diferentes estrategias para competir por los ribosomas y los componentes de la maquinaria celular necesarios para la síntesis proteica. Una de estas estrategias es utilizar proteasas que hidrolizan factores claves en el inicio de la traducción no necesarios para los ARNm virales. La proteólisis de estos factores interfiere en la circularización de los mensajeros e induce apoptosis o inhibición de la traducción mientras el genoma viral se replica (Zhang y col., 2007). PABP es hidrolizada en la región flexible rica en prolinas entre los RRM (I-IV) y el dominio C-terminal durante una infección viral por las proteasas 2C y 3C de Poliovirus (Joachims y col., 1999; Kuyumcu-Martínez y col., 2002; Bonderoff y col., 2008; Rivera y Lloyd, 2008), de Coxsackievirus (Kerekatte y col., 1999; Marissen y col., 2004), y por la proteasa 3C de

Hepatovirus (VHA) (Zhang y col., 2007), donde el resultado de la hidrólisis conlleva una inhibición significativa de la traducción. En las condiciones de nuestros ensayos no se induce apoptosis ni se producen infecciones virales, por lo que los mecanismos anteriormente descritos no son responsables de la aparición de la forma procesada. Si bien, nuestra secuencia LiPABP procede del ADN extraído de promastigotes cuyo cultivo en el laboratorio o su desarrollo en el intestino medio del vector se realiza a 26°C, que difiere de la temperatura habitual de 37°C utilizada en cultivos celulares eucariotas. Esta diferencia de temperatura podría estar implicada en la degradación de ciertas proteínas relacionadas con la inhibición de procesos todavía no esclarecidos, que se producen en la transformación del estadio promastigote extracelular a la forma amastigote intracelular.

Por otro lado, en la bibliografía encontramos lo que algunos autores denominan isoformas de PABP citoplasmáticas. PABP (PABPC1) es una proteína de transporte núcleo-citoplasma que, en ausencia de perturbaciones extrafisiológicas, se encuentra localizada exclusivamente en el citosol (Afonina y col., 1998; Thakurta y col., 2002). Las formas nucleares de PABPs identificados en levadura y en mamíferos en los años 80 por Sachs y col correspondían, según los autores, a fragmentos de PABPs citoplasmáticos que habían perdido el extremo carboxilo (Sachs y Kornberg, 1985; Sachs y col., 1986). Los extractos presentaban dos PABPs, una citoplasmática de entre 70 y 80 kDa y una nuclear de entre 50 y 60 kDa (Sachs y Kornberg, 1985). Años más tarde, en el erizo de mar, se identificaban también dos isoformas de aproximadamente 66 y 80 kDa, tanto en el citoplasma como en las fracciones nucleares (Drawbridge y col., 1990). Actualmente está descrito que la PABP nuclear, PABPN1 (PABP2) es una proteína de 33 kDa que contiene una región ácida en su extremo N-terminal, un solo motivo RRM en la parte central de la proteína, y un extremo C-terminal rico en Arg (Nemeth y col., 1995). Esta estructura difiere en tamaño y analogía de los dominios de la encontrada en la secuencia de LiPABP, por lo que la forma procesada de 50 kDa de *L. infantum* no corresponde a una PABP nuclear como las descritas en humanos (Brais y col., 1998), ratón (Lee y col., 1998) y *Drosophila* (Brand y col., 1995; Benoit y col., 1999), que se encuentra en el citoplasma.

2.2. LiPABP es sustrato de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 MAPK

La ruta de la proteína p38 quinasa activada por mitógenos es activada por estrés celular y estímulos proinflamatorios y en ella intervienen una quinasa de la quinasa activada por mitógeno o MAPKK (MKK3 y MKK6), la quinasa p38 o p38 MAPK, y la quinasa 2 activada por la quinasa activada por mitógenos o MAPKAPK (MK2).

La activación de esta cascada tiene multitud de efectos celulares y uno de ellos consiste en estabilizar un amplio rango de ARNm, en particular aquellos que codifican para proteínas implicadas en inflamación, estableciendo un papel regulador de la vía de p38 a nivel post-transcripcional (Clark y col., 2003). Aunque el mecanismo todavía no está claro, la activación de p38 MAPK bloquearía la capacidad de los elementos AREs (*AU-rich elements*) para desestabilizar el ARNm (Winzen y col., 1999; Lasa y col., 2000). Los AREs son elementos ricos en AU (motivos AUUUA) situados en las regiones 3' UTR de los ARNm de muchas citoquinas, factores de crecimiento y protooncogenes (Shaw y Kamen, 1986), y están implicados en procesos de deadenilación, degradación y promoción de la eliminación de la estructura *cap* de estos ARNm. Así, la estabilidad de transcritos que contienen AREs es debida a la inhibición de la capacidad de deadenilación, como consecuencia de la activación de p38 MAPK (Dean y col., 2003; Dean y col., 2004). Esta regulación parece que podría actuar directamente sobre una deadenilasa por ahora desconocida y/o, alternativamente, actuar sobre PABP. Acorde con estos resultados, ese mismo año Bollig y col, identificaron proteínas de unión a elementos AREs (ARESBP), estabilizadoras de ARNm, entre las que se destacaba la proteína PABP fosforilada definiendo además que esta proteína era diana para MK2 (MAPKAPK), quinasa sustrato de p38 MAPK (Bollig y col., 2003). Sin embargo, posteriormente, el grupo de Rowlett (Rowlett y col., 2008), descartó esa posibilidad, demostrando que era p38 la responsable de la fosforilación de PABP.

Para estudiar este suceso incubamos LiPABP recombinante con p38 MAPK eucariota en un ensayo *in vitro* con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP. Los resultados que muestra la Figura 18 revelan que LiPABP es diana de la quinasa p38 MAPK.

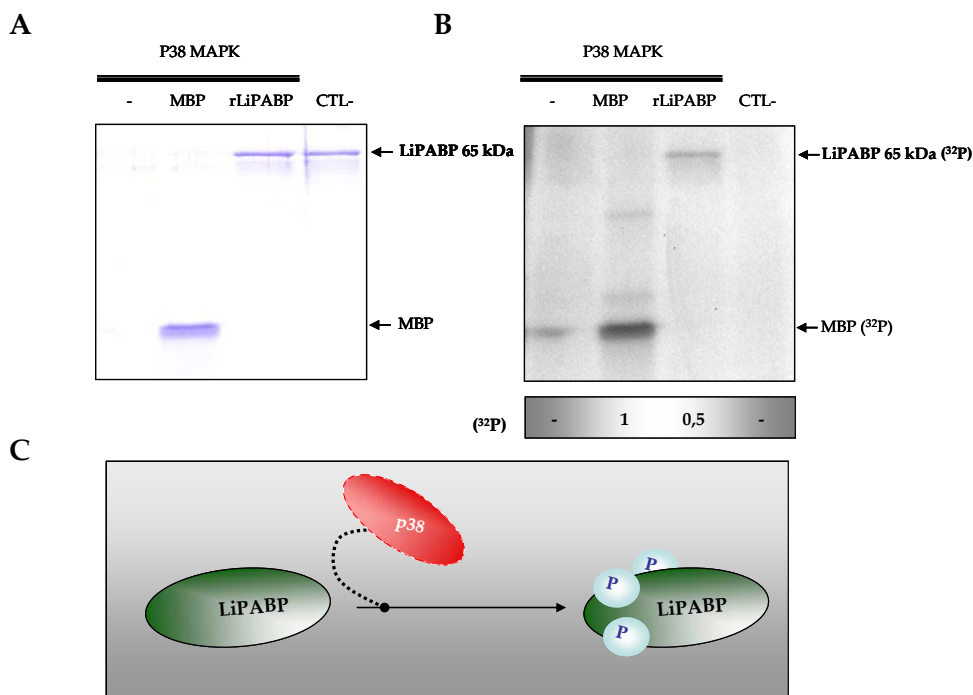


Figura 18. Fosforilación de LiPABP. La actividad quinasas de p38 MAPK se ha realizado tal y como se describe en *Material y Métodos*. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE (15%) y se incubó con *Solución azul de Coomassie* (**A**), previo a una autorradiografía (**B**). El ensayo se ha llevado a cabo sin sustrato (-), con MBP (MBP; proteína básica de la mielina, sustrato de p38), con LiPABP recombinante (rLiPABP), y sin enzima (CTL-). La cuantificación de 32 P incorporado a MBP se ha normalizado a 1 y los datos se muestran en la tabla. Membrana representativa de varios experimentos realizados. (**C**) Modelización del resultado.

La fosforilación descrita en PABP (Rowlett y col., 2008) se produce en la región menos implicada en la unión a poli(A), que corresponde a los dominios RRM III y IV, regiones que pueden inhibir la degradación del ARNm por su unión a elementos ARE (Sladic, 2004), y al extremo C-terminal. Y aunque existen proteínas como la Tristetraprolina (TPP), también implicada en la estabilidad del ARNm, que es diana tanto para MK2 como p38 MAPK (Chrestensen y col., 2004), todavía se desconoce cómo se produce la regulación de PABP por quinasas. Estudios previos en levaduras confirman a Pab1p (PABP en *Sacharomyces cerevisisiae*) como una ARESBP (proteína de unión a elementos ARE) modulada directa o indirectamente por la vía p38 MAPK (Vasudevan y col., 2005).

Con objeto de identificar en la proteína LiPABP posibles residuos susceptibles de ser fosforilados, se realizó un análisis más exhaustivo, utilizando diversas herramientas

informáticas, lo que nos ha permitido identificar un motivo MLDSPT presente en la región C-terminal de LiPABP, que es diana de p38 MAPK (Figura 19A).

En *L. major* se identifican dos isoformas de 69 y 75 kDa, siendo esta última la forma hiperfosforilada de la proteína LmPABP1. Las dos isoformas se localizan en el citoplasma y en el núcleo, pero la isoforma de 69 kDa es más abundante en el compartimento nuclear (Bates y col., 2000). Los mecanismos que regulan la importación y exportación nuclear de las PABP citoplasmáticas hasta el momento son poco conocidos, y aparentemente carecen de señal de localización nuclear o exportación. Sin embargo, estudios recientes han identificado un motivo de exportación nuclear dependiente de transcripción o TD-NEM (Khacho y col., 2008) en la proteína PABP. Este motivo, DXGXXDXXLR se encuentra cerca del inicio del dominio RRM IV de la secuencia de la proteína, y su inhibición transcripcional mediante eliminación conduce a la acumulación de PABP en el núcleo. La proteína LiPABP presenta un dominio similar y en la misma localización que la proteína PABP de humanos (Figura 19B).



Figura 19. Determinación de posibles motivos funcionales. El detalle de las secuencias se ha obtenido de la comparación realizada con varias PABPs de la Figura 12. (A) En color rojo se muestra el motivo diana de p38 MAPK detectado con el servidor ELM, y localizado en el dominio PABC (línea amarilla-verdosa). (B) El dominio descrito de exportación nuclear en los residuos iniciales del RRM IV (línea azul), se muestra en color granate en detalle y localizado en las secuencias comparadas.

Se ha observado la presencia nuclear de PABP citoplasmáticas o de PABP mutantes que contienen deleciones de dominios RRMs y del extremo C-terminal cuando existe una sobreexpresión de proteína (Afonina y col., 1998), o una inhibición del factor de exportación nuclear CRM1 (*chromosome región maintenance 1*) (Woods y

col., 2002). Es interesante destacar además, que se produce una redistribución al núcleo de PABP, durante la infección de algunos virus como *Rotavirus* (Harb y col., 2008) y gammaherpesvirus KSHV (herpes virus asociado a sarcoma de Kaposi) (Lee y Glaunsinger, 2009). Todos estos datos y la presencia en la proteína LiPABP de una secuencia similar de exportación nuclear, nos llevarían a estudiar en futuros experimentos los estímulos que pueden desencadenar cambios en la localización subcelular de LiPABP y el posible papel de la fosforilación bajo estos estímulos.

2.3. LiPABP se une a secuencias de adeninas

La función más característica de las proteínas PABPs es su capacidad de unión a secuencias de adenina situadas en el extremo 3' de los ARNm. Para comprobar si esta función está conservada en la proteína LiPABP de *L. infantum* planteamos varios ensayos de unión a cadenas de poli(A) conjugadas a resina sefarosa. La unión de las PABPs a largo del tramo poliadenilado del ARNm (Baer y Kornberg, 1980, Baer y Kornberg, 1983), presenta una K_D de aproximadamente 2-7 nM y, aunque es suficiente un mínimo de 12 residuos de adeninas para la interacción (Sachs y col., 1987; Deardorff y Sachs, 1997; Deo y col., 1999), en células de mamíferos se ha demostrado que son 27 adeninas las que finalmente interaccionan con 1 monómero de PABP (Baer y Kornberg, 1980), y 25 las que lo hacen en levaduras (Sachs y col., 1986).

El reconocimiento de las adeninas se produce por la combinación de fuerzas de van der Waals, puentes de hidrogeno, puentes salinos, e interacciones debidas al apilamiento de bases con los residuos conservados que se encuentran en los motivos RNPs de los RRMs (Deo y col., 1999). El poli(A) comercial que hemos utilizado contiene aproximadamente 100 nucleótidos y debería ser suficiente para acomodar al menos 4 moléculas de PABP. Además, estudios de unión de PABP con oligoribonucleótidos de tamaños entre 25 y 65 adeninas muestran que las cadenas cortas de poli(A) no son el sustrato ideal para este tipo de modelos de interacción, ya que en condiciones normales los ARNm presentan largas colas de poli(A) (Yang y Hunt, 1992; Khanam y col., 2006). Para analizar la afinidad de la unión planteamos ensayos competitivos añadiendo poli(A) libre el cual compite con el poli(A) conjugado

a la resina por las PABPs. Con el objetivo de poner a punto el modelo de interacción, analizamos en primer lugar la unión de PABP eucariota con la poli(A)-sefarosa, utilizando lisados de células HEK293T incubadas o no en presencia de poli(A) libre. Los resultados confirman la interacción de PABP de mamíferos por la cola poli(A) y la eficacia del método (Figura 20A). Por otra parte, los resultados obtenidos con lisados de células HEK293T que sobreexpresan LiPABP muestran que la resina poli(A)-sefarosa es capaz de retener un ~50% de la proteína LiPABP presente en el lisado celular (Figura 20B), y que dicha retención disminuye a un 16% en presencia de poli(A) libre..

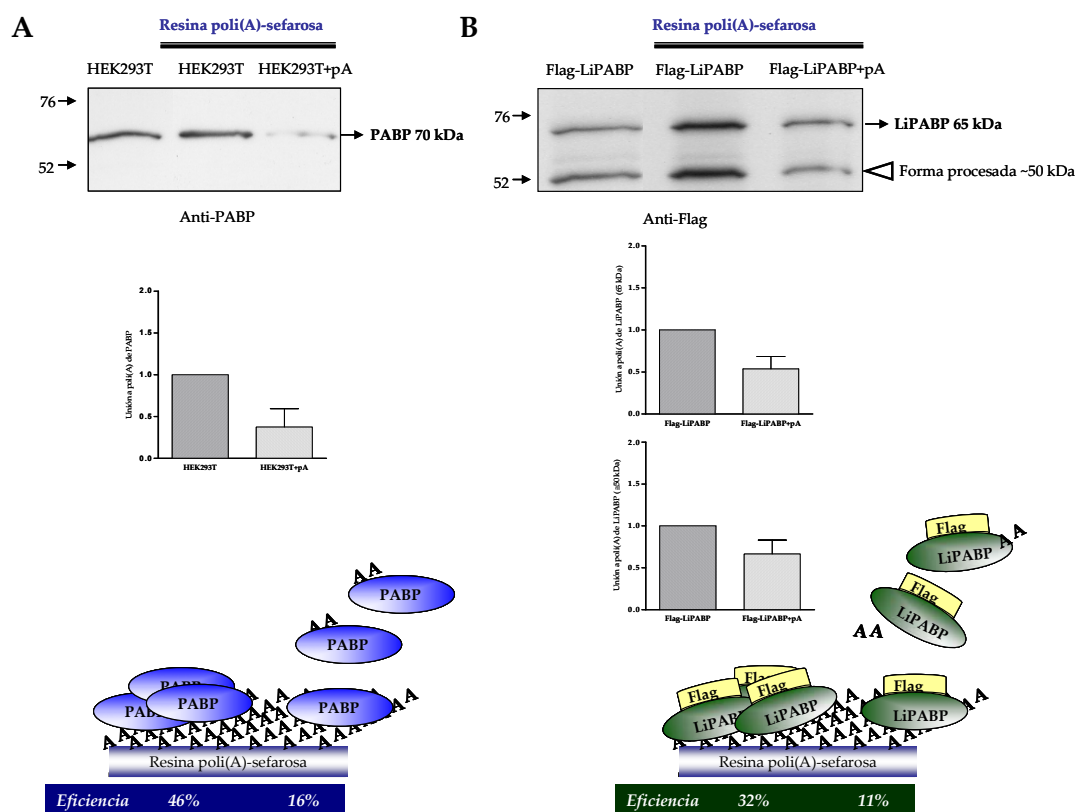


Figura 20. Capacidad de unión de las proteínas PABP y LiPABP a una cadena de nucleótidos de adenina. Purificación con poli(A)-sefarosa de las proteínas PABP y LiPABP presentes en lisados de células HEK293T. (A) SDS-PAGE (12%) de poli(A)-sefarosa incubada con 50 µg de extracto de células HEK293T sin poli(A) libre (HEK293T) y con poli(A) (HEK293T+pA), e inmunodetección con anticuerpo anti-PABP eucariota (B) SDS-PAGE (12%) e inmunodetección con anticuerpo anti-Flag de 25 µg de extracto de células HEK293T con Flag-LiPABP sobreexpresada, sin poli(A) libre (Flag-LiPABP) y con poli(A) (Flag-LiPABP+pA), incubada con poli(A)-sefarosa. En los paneles superiores se muestran membranas representativas de varios experimentos realizados y en las gráficas inferiores de cada membrana se muestran los datos obtenidos de cuantificar diferentes experimentos. Los controles (HEK293T y Flag-LiPABP) se han normalizado a 1. (C) Modelización del ensayo. La valoración de la capacidad de unión de la poli(A)-sefarosa a la proteína se indica en porcentaje, el cálculo se ha realizado con los datos de expresión para cada experimento obtenidos de 10 µg de lisado HEK293T sin purificar.

Los ensayos con LiPABP sobreexpresada en células HEK293T demuestran que tanto la forma de la proteína completa de 65 kDa como la forma procesada de ~50 kDa son capaces de unir secuencias de A (Figura 20B). El hecho de que poli(A) libre sea capaz de disminuir la retención de LiPABP por la resina, demuestra que esta unión es específica.

Respecto a la caracterización de los dominios de interacción con poli(A), estudios de los motivos separados y combinados unos con otros, indican que RRM I por sí sólo es incapaz de unir poli(A), pero en combinación con los RRM II y III permite discriminar entre poli(A) y poli(U). Por su parte, el motivo RRM IV tiene elevada capacidad de unión a poli(A) pero reducida capacidad de discriminar entre poli(A) y poli(U) (Khanam y col., 2006). Las dos proteínas que se observan en nuestros ensayos unen poli(A) de la misma forma; por tanto, el dominio PABC, presente en el extremo C-terminal de la LiPABP completa y ausente en la forma procesada, no interacciona con la secuencia de adeninas, mientras que esta unión reside en los RRM, tal y como esta descrito para las PABPs eucariotas.

3. RECONOCIMIENTO DE LiPABP POR SUEROS DE PERROS INFECTADOS CON *L. infantum*

3.1. Antigenicidad de LiPABP

Los componentes implicados en la virulencia del parásito *Leishmania* se pueden dividir en dos grupos diferentes. Por un lado, los elementos de superficie y productos de secreción del parásito y, por otro, las moléculas intracelulares o también llamadas “patoantígenos”. Estas últimas son proteínas citoplasmáticas muy conservadas con epítomos únicos e inmunológicamente activos en leishmaniasis. La exposición se produce por la citolisis periódica del parásito durante la infección natural, de forma accidental o mediada por mecanismos específicos (Zhang y col., 2007). Algunos antígenos de *Leishmania* se han expresado como proteínas recombinantes y se ha estudiado su potencial en el diagnóstico serológico (Meddeb-Garnaoui y col., 2010; Requena y col., 2000). Está descrito, por otro lado, que muchos antígenos de diferentes

parásitos contienen a su vez repeticiones en tándem en su estructura, que funcionan como inductores de la activación de linfocitos B y, por tanto, contienen epítomos reconocidos por los mecanismos de respuesta humoral (Hoft y col., 1989; Goto y col., 2006; Goto y col., 2008). Se han descrito en *L. infantum* proteínas que se unen al extremo 3' del ARNm, como la familia PUF, que están implicadas en el control de la localización, estabilidad y traducción de los mensajeros y contienen en su estructura dominios repetidos en tándem. Estas proteínas se han identificado como antígenos de linfocitos B en modelos animales y en pacientes con LV, si bien algunas de ellas presentan reacción cruzada con pacientes infectados con *T. cruzi* (Folgueira y col., 2010).

La proteína LiPABP presenta cuatro dominios en tándem y nos planteamos si puede ser considerada como “patoantígeno” durante la infección de *Leishmania*. Para ello examinamos la presencia de anticuerpos frente a LiPABP recombinante en sueros de perros con LV canina (Figura 21).

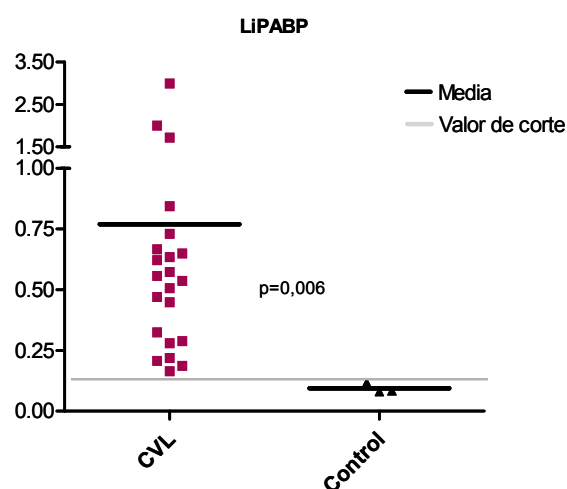
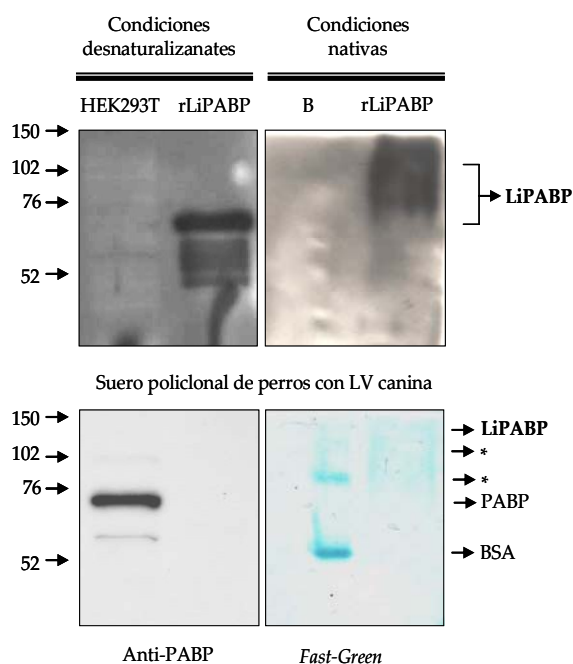


Figura 21. Análisis de la reactividad IgG frente a LiPABP. Valoración mediante E.L.I.S.A de la respuesta humoral de perros (n=28) infectados con *L. infantum* y que presentan LV canina, frente a LiPABP. Los sueros (CVL) se incubaron con 0,2 µg de LiPABP recombinante y como control se utilizaron muestras de suero de animales sanos (Control). Los datos se presentan como la medida de absorbancia a 492 nm que se obtiene con anticuerpos de oveja anti-IgG de perro, conjugado con peroxidasa. Las diferencias encontradas son significativas (**p<0,01; test U-Mann Whitney). El valor de corte (*cut off*=0,1444) se ha obtenido de tres desviaciones estándar por encima de la absorbancia media de sueros controles. La media y el valor de corte se muestran en línea negra y gris, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 21, la concentración de IgGs en suero de perros infectados con *L. infantum* es significativamente reactiva ($p=0,006$) y no existe prácticamente actividad en el grupo control frente a LiPABP. En el grupo de animales enfermos (CVL), todos los sueros presentan valores de absorbancia por encima del valor de corte ($cut\ off=0,1444$) calculado en el grupo de animales sanos y 4/25 sueros del grupo CVL son muy reactivos frente a LiPABP, con valores por encima de la media de absorbancias, lo que indica que LiPABP es un potente inmunógeno. Con objeto de obtener un suero que reconozca LiPABP, seleccionamos y purificamos los sueros de los 4 animales más reactivos, y evaluamos su capacidad de detección frente a LiPABP y a las proteínas eucariotas PABP y BSA, en condiciones desnaturalizantes y en condiciones nativas, respectivamente. En la Figura 22 se muestra que el suero policlonal reconoce exclusivamente LiPABP tanto en forma desnaturalizada como en forma nativa, y no presenta reactividad cruzada frente a otras proteínas eucariotas.

Figura 22. Análisis de la especificidad del suero policlonal purificado de perros con LV canina. Con el suero de animales con LV, purificado a partir de 4 sueros reactivos para LiPABP, se ha estudiado su reconocimiento específico mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no disociantes, frente a proteínas de un lisado de la línea HEK293T (HEK293T), la proteína LiPABP recombinante (rLiPABP) y BSA (B). El panel superior muestra la detección exclusiva en su forma desnaturalizada y nativa de la proteína, por parte del suero policlonal. En el panel inferior, las membranas se han incubado con anticuerpo anti-PABP eucariota (izquierda) y se ha teñido con *Fast Green* (derecha). El símbolo *, indica las formas multiméricas que puede adoptar la proteína BSA en condiciones nativas.



Una vez comprobado que este suero detecta de forma eficaz y específica la proteína LiPABP recombinante, nos planteamos comprobar si también era capaz de

detectar de forma específica la proteína expresada en distintas líneas celulares, así como LiPABP endógena en *L. infantum*.

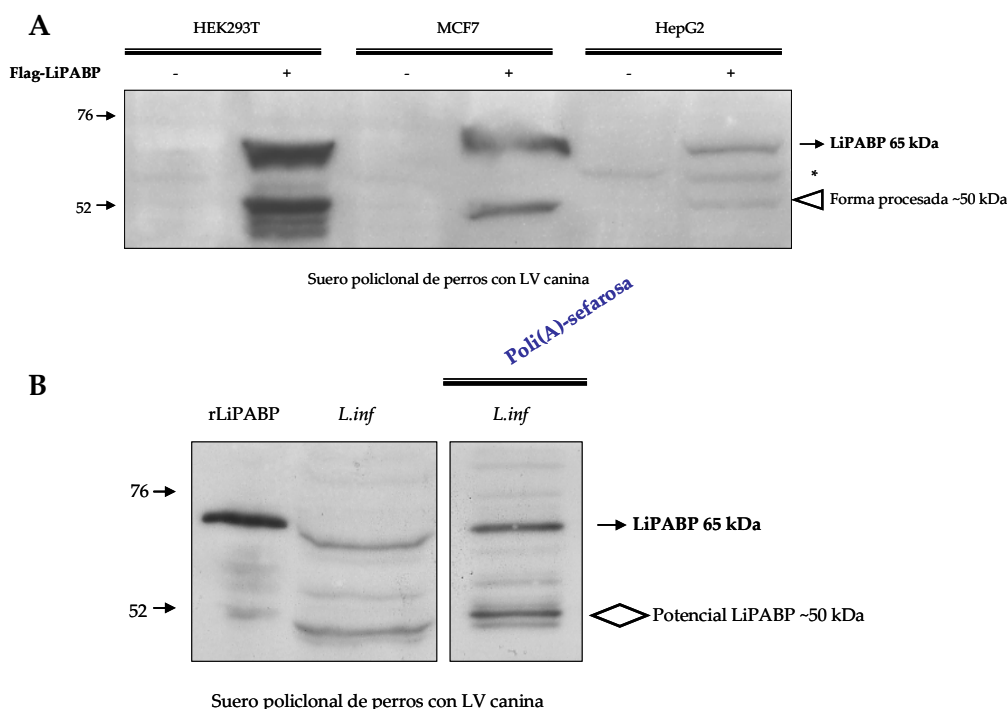


Figura 23. Detección de LiPABP endógena. SDS-PAGE (10%) e inmunodetección con suero policlonal de perros infectados con LV canina, de la proteína LiPABP sobreexpresada (Flag-LiPABP) en las líneas celulares HEK293T, MCF7 y HepG2 (A), y de la proteína recombinante LiPABP (rLiPABP), LiPABP endógena presente en lisados de *L. infantum* (*L. inf*), y purificada con resina poli(A)-sefarosa (*L. inf*) (B).

En la Figura 23 se muestra que el suero reconoce la proteína LiPABP recombinante, LiPABP sobreexpresada en células HEK293T, MCF7 y HepG2, y LiPABP endógena en *L. infantum*. Estos resultados indican que la proteína LiPABP sobreexpresada en células eucariotas y la proteína LiPABP endógena en *L. infantum* sufren proteólisis de la misma forma en su extremo C-terminal, pues se observan dos bandas de proteína de ~65 kDa y ~50 kDa, siendo mayoritaria la proteína completa de ~65 kDa. Como hemos indicado en apartados anteriores, hemos denominado forma procesada de ~50 kDa al producto de proteólisis en células eucariotas, y a la banda de menor tamaño observada en *L. infantum*, la denominamos como potencial LiPABP de ~50 kDa. Se observa también una menor movilidad electroforética de la proteína recombinante (Figura 23B) y de las formas presentes en la línea celular eucariota, debido a la presencia de las colas o etiquetas en su extremo N-terminal, His o Myc/Flag

respectivamente (Terpe, 2003). Para asegurarnos que las dos bandas presentes en el lisado de *L. infantum* corresponden a LiPABP, hemos realizado una purificación basada en la afinidad por la secuencia de Adeninas que presenta LiPABP, de igual forma que las PABP eucariotas la tienen por la cola poli(A) de los ARNm (Deo y col., 1999), y que hemos descrito en apartados anteriores. De esta forma y como se muestra en la Figura 24B, la resina poli(A)-sefarosa retiene las formas de LiPABP presentes en un lisado de *L. infantum* y son detectadas por el suero reactivo policlonal a la misma altura que LiPABP recombinante, sobreexpresada en células HEK293T y endógena en *L. infantum*.

La utilización de este suero reactivo nos ha permitido conocer la cantidad de LiPABP que puede encontrarse en el parásito. Para ello hemos confeccionado una curva con diferentes concentraciones de proteína recombinante, que nos permite extrapolar la medidas de D.O obtenidas de varias concentraciones de lisados de *L. infantum*. Como resultado determinamos que 2,5 ng de LiPABP por μg de proteína están presentes en lisados de *L. infantum* procedentes de cultivos estacionarios con $1-2 \times 10^7$ células/ml (Figura 24).

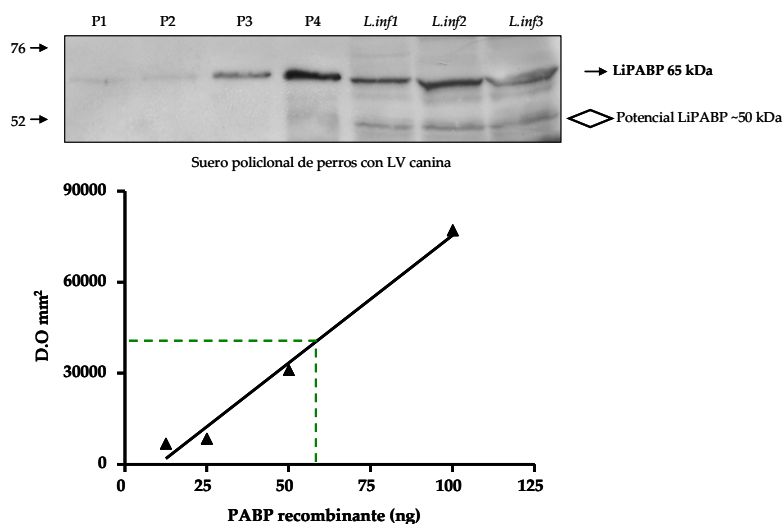


Figura 24. Curva de concentración de LiPABP. Las medidas de D.O en mm^2 obtenidas de la cuantificación de diferentes bandas de LiPABP recombinante, a concentraciones de 12,5 ng (P1), 25 ng (P2), 50 ng (P3) y 100 ng (P4), se han utilizado para confeccionar una recta patrón ($r^2=0,9851$), en la que las diferentes medidas de D.O de varias concentraciones de lisados de *L. infantum*; 25 μg (*L.inf1*), 50 μg (*L.inf2*) y 100 μg (*L.inf3*), se han extrapolado para determinar su concentración en el parásito. La inmunodetección se ha realizado con el suero policlonal purificado de perros infectados con LV canina, sobre las proteínas transferidas a membrana en un gel de SDS-PAGE (10%).

3.2. LiPABP une específicamente secuencias de adenina en *L. infantum*

Para confirmar finalmente que LiPABP endógena se comporta como una proteína de unión a poli(A), realizamos los ensayos competitivos con poli(A) libre y retención de LiPABP a resina poli(A)-sefarosa. Como se observa en la Figura 25, la presencia de adeninas libres interfiere de forma competitiva en la interacción de LiPABP con la resina poli(A)-sefarosa.

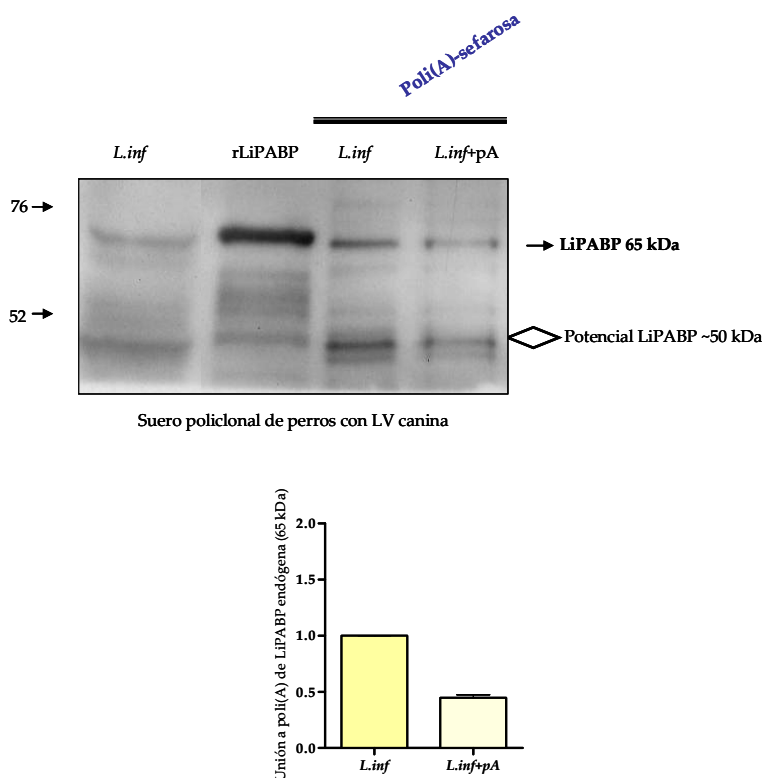


Figura 25. Capacidad de unión de la proteína LiPABP endógena a una cadena de nucleótidos de adenina. SDS-PAGE (10%) e inmunodetección con suero policlonal de perros infectados con LV de 100 µg de fracción soluble *L. infantum* sin poli(A) libre (*L.inf*) y con poli(A) (*L.inf+pA*), incubada con poli(A)-sefarosa. Como control de banda de LiPABP, se ha incluido la fracción soluble *L. infantum* (*L.inf*) y la proteína LiPABP recombinante (rLiPABP). En el panel superior se muestra una membrana representativa de tres experimentos realizados y en la gráfica inferior se muestran los datos obtenidos de cuantificar los tres experimentos. El control se ha normalizado a 1.

Ante estos resultados podemos considerar a LiPABP como una proteína que se encuentra en *L. infantum* que une adeninas, antigénica y diana específica de la respuesta humoral durante la infección de *L. infantum* y considerar su estudio a nivel inmunológico en relación parásito-huésped, en el desarrollo de vacunas y como objetivo de nuevas herramientas de diagnóstico y/o inmunoterapia.

4. SELECCIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS FRENTE A LiPABP

Los aptámeros son estructuras de ácido nucleico, obtenidos de librerías de oligonucleótidos mediante ciclos consecutivos de selección (metodología SELEX). Así, la heterogeneidad de la población inicial que contiene alrededor de 10^{24} moléculas disminuye, resultando una población enriquecida y homogénea de aptámeros que unen con alta afinidad y especificidad a su proteína diana. Posteriormente, aptámeros individuales son identificados de esta población y caracterizados por su afinidad de unión y actividad biológica.

4.1. Selección de aptámeros que interaccionan con la proteína LiPABP

La selección de aptámeros de ADN específicos frente a la proteína LiPABP se realizó a partir de una librería de ADN de cadena sencilla que contiene una región de 40 nucleótidos de secuencia al azar flanqueada por dos regiones conservadas de 18 nucleótidos de longitud que permiten la amplificación de los aptámeros seleccionados por PCR. El número de ciclos en la PCR fue optimizado para evitar la aparición de moléculas de mayor tamaño quedando finalmente fijado en 15. Por otra parte, la astringencia de la selección fue controlada ajustando las concentraciones de aptámeros, el tiempo de incubación y los lavados. La población inicial que utilizamos tiene un número teórico de 10^{14} – 10^{16} moléculas de secuencia diferente. Tras la incubación de esta población con la proteína LiPABP, algunos de los oligonucleótidos se unen a la diana y son posteriormente amplificados con los cebadores llamados F3 5' y R3 3'. La población enriquecida es sometida a una nueva ronda de selección como anteriormente. De esta manera, hemos realizado 4 rondas sucesivas de selección.

En una primera aproximación, se analizó la afinidad de unión a LiPABP de la población inicial RND40 y de la población obtenida tras la selección (SELLiPABP) mediante ensayos de E.L.O.N.A, técnica que permite un rápido análisis de la capacidad de unión relativa a la diana. Como puede observarse en la Figura 26, la población SELLiPABP mostraba una capacidad de unión a LiPABP significativamente superior respecto a la población inicial. Estos datos demuestran claramente que SELLiPABP está

enriquecida en secuencias de ADNmc que reconocen la proteína LiPABP respecto a RND40. A la vista de estos resultados, se decidió caracterizar diferentes aspectos de SELLiPABP para determinar si esta población de aptámeros podría usarse para identificar aptámeros individuales que pudiesen ser posteriormente utilizados en diferentes aplicaciones.

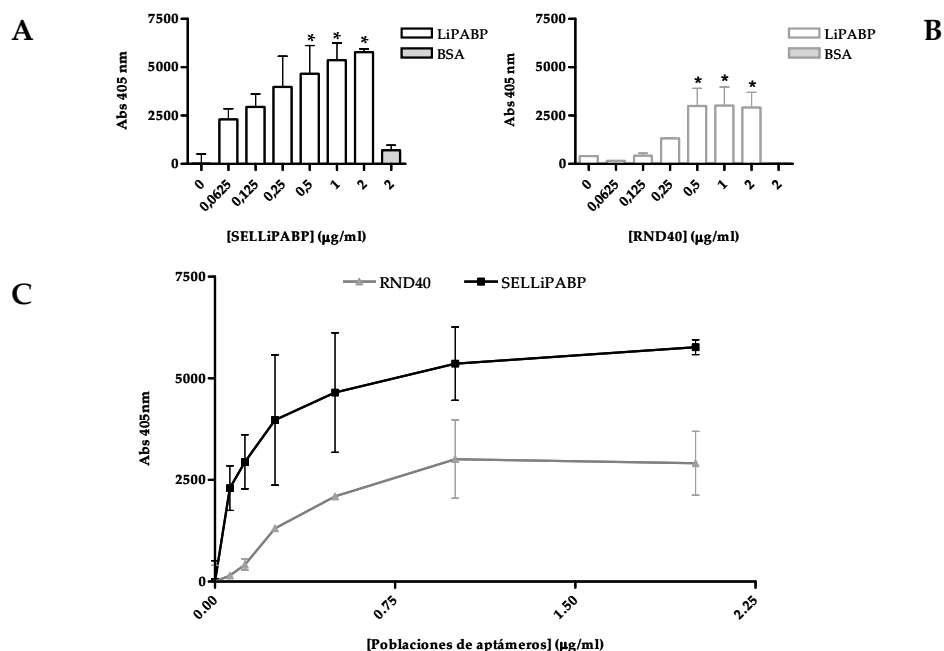


Figura 26. Diferencias en la capacidad de unión a LiPABP de la población de aptámeros SELLiPABP y la población inicial RND40. Los análisis de unión a proteína se realizaron mediante E.L.O.N.A. tal y como se describe en *Material y Métodos*. La población seleccionada SELLiPABP marcada con digoxigenina (A), y la población de aptámeros de partida RND40, también marcada con digoxigenina (B), fueron incubadas a concentraciones crecientes (0,0625-2 μg/ml), con la proteína de *L. infantum* LiPABP, dispuesta en placa a una concentración de 0,5 μg/pocillo (7,6 pmol) y con BSA 0,5 μg/pocillo (7,6 pmol) utilizada como control. Los diagramas de barras representan la Media ± S.E.M. de varios experimentos. Diferencias estadísticas entre valores de concentración de SELLiPABP y su valor de concentración 0 de población de aptámeros (* $p < 0,05$; ANOVA seguido de un test Dunnet). (C) Comparación de los valores de absorbancias entre las dos poblaciones.

4.2. Límites de detección de la población SELLiPABP por la proteína LiPABP

Para estudiar la afinidad de la población de aptámeros SELLiPABP por la proteína LiPABP, se realizaron ensayos de E.L.O.N.A en los que 0,625 μg (9,5 pmol) de la proteína recombinante LiPABP o de BSA, proteína utilizada como control, fueron incubadas con varias cantidades de SELLiPABP marcada con digoxigenina como se describe en *Material y Métodos*. Los datos obtenidos fueron analizados usando una

regresión no lineal mostrando que responden a una curva hipérbola cuya ecuación es $y=(x \times B_{max})/(x + K_D)$, donde B_{max} es la unión máxima y K_D (constante de disociación) es la concentración de aptámero requerida para alcanzar la mitad de la unión máxima. Los datos presentados en la Figura 27A indican que la población SELLiPABP es capaz de detectar la proteína LiPABP recombinante de una forma dependiente de la concentración con una $K_D = 4,8 \pm 2,0$ nM, significativamente menor que la obtenida para RND40 ($K_D = 21,2 \pm 12,8$ nM), calculada a partir de los datos de la Figura 26C. Un análisis más detallado de los datos del E.L.O.N.A, representados en los diagramas de barras de la Figura 27A, muestra que concentraciones superiores a 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ de SELLiPABP son capaces de detectar 0,625 μg de la proteína recombinante LiPABP de manera significativa ($p < 0,01$; ANOVA seguido de test de Dunnett's).

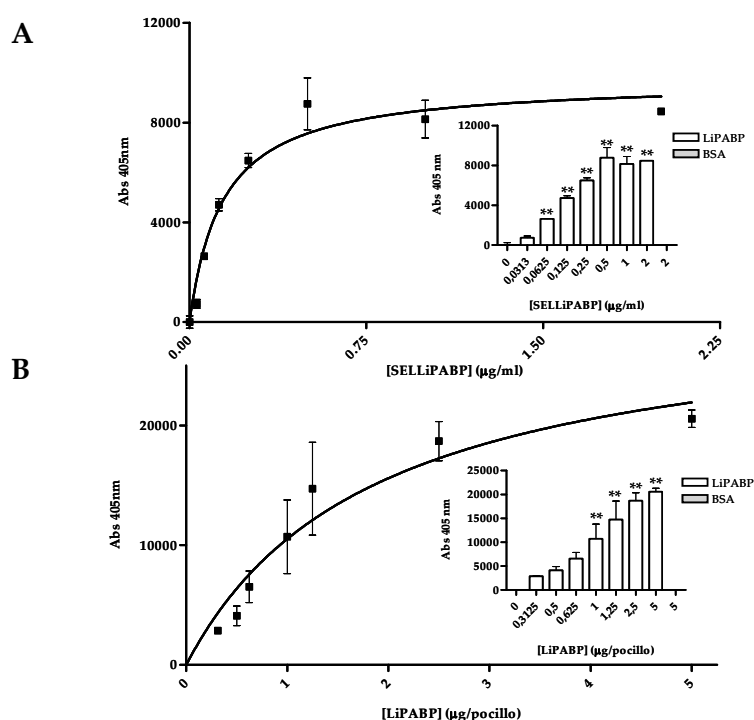


Figura 27. Reconocimiento dependiente de concentración de la población SELLiPABP. Mediante E.L.O.N.A. se determinó los límites de detección de SELLiPABP. (A) Varias concentraciones de SELLiPABP marcada con digoxigenina 0,0313-2 $\mu\text{g/ml}$ se incubaron con LiPABP dispuesta en placa a 0,625 $\mu\text{g/pocillo}$ (9,5 pmol). (B) La proteína recombinante LiPABP se dispuso en placa en diferentes concentraciones de 0,3125-5 $\mu\text{g/pocillo}$ (4,7-76 pmol) y se incubó con 2 $\mu\text{g/ml}$ de SELLiPABP marcada con digoxigenina. En ambas situaciones se utilizó BSA como control negativo. Los datos se han ajustado a una función ($y=(x \times B_{max})/(x + K_D)$) para los cálculos de K_D ($K_D = 4,8 \pm 2,00$ nM). En el interior de las curvas se muestran los datos en diagramas de barras que representan la Media \pm S.E.M. de varios experimentos independientes. Diferencias estadísticas entre cada valor de concentración de SELLiPABP (A) o LiPABP (B) y su valor de concentración 0 de población de aptámeros o de proteína respectivamente (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$; ANOVA seguido de un test Dunnet).

Para determinar la sensibilidad de la población policlonal SELLiPABP, se realizó un segundo grupo de ensayos en los que concentraciones crecientes de la proteína entre 0,3125 y 5 µg/pocillo de LiPABP o 5 µg de BSA se incubaron con SELLiPABP marcada con digoxigenina a una concentración de 2 µg/ml como se describe en *Material y Métodos*. Como se muestra en la Figura 27B, la población SELLiPABP es capaz de detectar LiPABP de una manera dependiente de concentración pudiendo reconocer de forma significativa 1 µg de proteína (15,2 pmol) a una concentración de 2 µg/ml ($R^2 = 0,7800$; $p < 0,0001$; regresión lineal).

En vista de estos resultados, decidimos estudiar la unión de la población SELLiPABP a la diana usando una técnica alternativa. Así, se realizaron ensayos de Slot Blot en los cuales diferentes cantidades de LiPABP recombinante (0-25 ng) o BSA (25 ng) se depositaron sobre membranas de nitrocelulosa que luego fueron incubadas con distintas concentraciones de SELLiPABP marcada con digoxigenina. Los resultados obtenidos (Figura 28) muestran que SELLiPABP es capaz de detectar la proteína diana incluso a las concentraciones más bajas ensayadas (3,12 ng (47 fmol)) de LiPABP y una concentración de 1,25 µg/ml de SELLiPABP, mientras que en ningún caso se detecta la proteína control BSA.

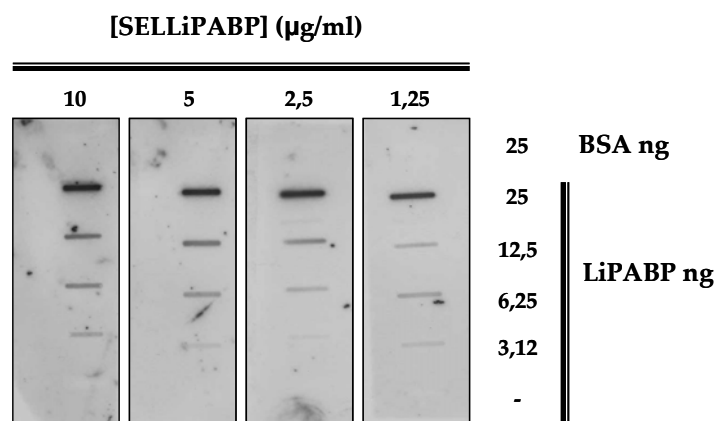


Figura 28. Valoración de la capacidad de unión por Slot Blot de SELLiPABP. Ensayos Slot Blot descrito el procedimiento en *Material y Métodos*, en los cuales diferentes cantidades de la población SELLiPABP (10-1,25 µg/ml), se incubaron con varias concentraciones de la proteína LiPABP entre 25 y 0,3125 ng (378-47 fmol). La proteína BSA fue utilizada como control negativo.

Los resultados mostrados anteriormente permiten concluir que la población de aptámeros obtenida, SELLiPABP, está enriquecida en aptámeros que reconocen con elevada afinidad la proteína recombinante LiPABP.

4.3. Especificidad de la unión SELLiPABP

Con objeto de estudiar la especificidad de la población de aptámeros seleccionada por su diana, se realizaron ensayos de Western Blot en los que proteínas totales de *L. infantum* así como fracciones citoplasmática y nuclear obtenidas a partir de las mismas, fueron inmovilizadas sobre membranas de PVDF e incubadas con la población de aptámeros SELLiPABP marcada con digoxigenina y detectada con anticuerpos anti-digoxigenina conjugadas con HRP. Sin embargo, todos los resultados mostraban el reconocimiento inespecífico de proteínas en todas las muestras analizadas (datos no mostrados). Una posibilidad que explicaría estos resultados es que los aptámeros de la población no sean capaces de reconocer eficientemente la proteína desnaturalizada. Así, mediante E.L.O.N.A. se ha estudiado la respuesta de SELLiPABP frente a las proteínas recombinantes de *L. infantum* LiIF2 α , LiIF2 β y LiIF2 γ , relacionadas con traducción en *L. infantum*, la histona H2A, la proteína ribosomal LiP2a, y el factor eucariótico eIF2 α . En estos ensayos, se fijaron 2 μ g de cada proteína sobre los pocillos y luego fueron incubadas en presencia de 1 μ g/ml de SELLiPABP (Figura 29).

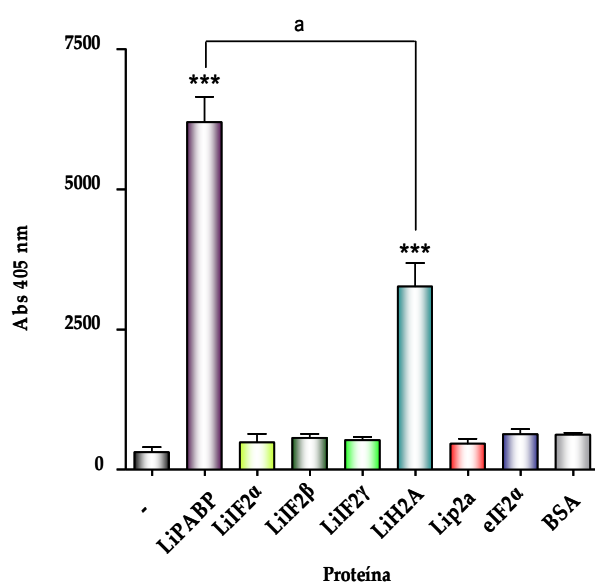


Figura 29. Especificidad de la población SELLiPABP. La capacidad de los aptámeros para discriminar proteínas se ha evaluado mediante E.L.O.N.A. Se disponen 2 μ g/pocillo de las proteínas recombinantes de *L. infantum* LiIF2 α , LiIF2 β , LiIF2 γ , LiH2A, LiP2a, y de eIF2 α y BSA eucariota, esta última como control negativo. Todas las proteínas se incubaron con 1 μ g/ml de SELLiPABP marcada con digoxigenina. Los diagramas de barras representan la Media \pm S.E.M. de cuatro ensayos independientes. Diferencias estadísticas con respecto al valor blanco del ensayo (***) $p < 0,001$; ANOVA; test Dunnet). Diferencias estadísticas entre las proteínas LiPABP y LiH2A (a, $p < 0,001$; t-Student).

Como puede observarse en la Figura 29, la señal alcanzada para LiPABP (6500 unidades Abs₄₀₅ en el ensayo mostrado) es 6 veces superior a la que se obtiene para el resto de las proteínas excepto para LiH2A, que muestra cierto reconocimiento cruzado,

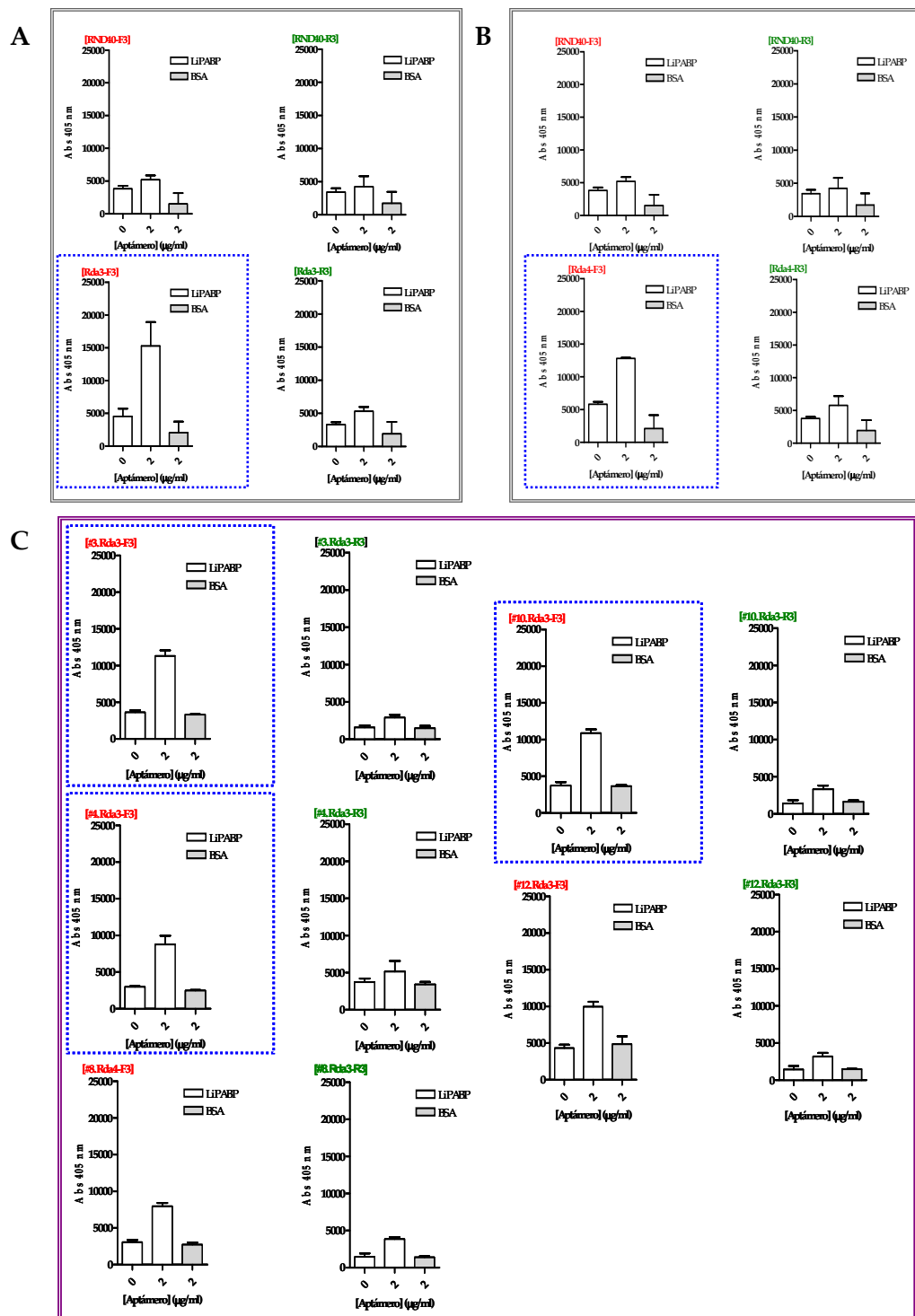
aunque en este caso, la señal de LiPABP es más de dos veces superior que la de LiH2A siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$; ANOVA seguido del test de Tukey). Teniendo en cuenta la naturaleza básica de LiH2A y la alta concentración de proteína utilizada en el ensayo, se puede concluir que el reconocimiento de LiH2A por SELLiPABP es totalmente inespecífico. Todos los resultados mostrados anteriormente permiten concluir que la población de aptámeros seleccionada, SELLiPABP, está lo suficientemente enriquecida en aptámeros capaces de reconocer con elevada afinidad la proteína recombinante LiPABP como para proceder al clonaje y caracterización de aptámeros individuales.

4.4. Identificación, clonaje y caracterización de aptámeros individuales

Una vez conseguida una población de aptámeros capaz de reconocer su molécula diana con elevada afinidad y especificidad, se procede a insertar cada una de las moléculas de la población en un vector para el aislamiento y caracterización de aptámeros individuales. En este caso, procedimos a clonar los aptámeros procedentes de las dos últimas rondas de selección que habíamos realizado y que habíamos denominado SEL3LiPABP y SEL4LiPABP. Para determinar cuál de las dos cadenas complementarias que resultan del paso de amplificación por PCR es la que corresponde con la secuencia que interacciona con la proteína diana, éstas se marcan con digoxigenina durante la PCR utilizando los cebadores F3 5'-dig y R3 3'-dig, respectivamente. Para estudiar cuales de los aptámeros obtenidos reconocen con mayor afinidad LiPABP, se realizaron ensayos de E.L.O.N.A. como anteriormente, en los que 1 μg (15 pmol) de proteína fueron depositados sobre los pocillos y posteriormente incubados con 2 $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los aptámeros obtenidos. Los resultados se muestran en la Figura 30. Comparando la población inicial (RND40) con SEL3LiPABP (Figura 30A) y con SEL4LiPABP (Figura 30C), las secuencias marcadas con el cebador F3 5'-dig de las dos poblaciones seleccionadas, son las responsables del enriquecimiento de la población. Como puede también observarse, existen aptámeros que no muestran un reconocimiento significativo de LiPABP y otros que son capaces de reconocer la proteína diana con mayor afinidad que la proteína control, como los clones #3.Rda3-F3, #4.Rda3-F3 y #10.Rda3-F3 (Figura 30B) y #3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3, siendo estos últimos los que presentan más afinidad por LiPABP (Figura

Resultados y Discusión

30D). La mayoría de las secuencias, excepto #11.Rda4-R3, marcadas con F3 3'-dig presenta afinidad por LiPABP, de la misma forma los 1 $\mu\text{g/ml}$ (15,2 pmol) de BSA utilizados como control, no son reconocidos por ningún conjunto o secuencia individual de ácido nucleico.



D

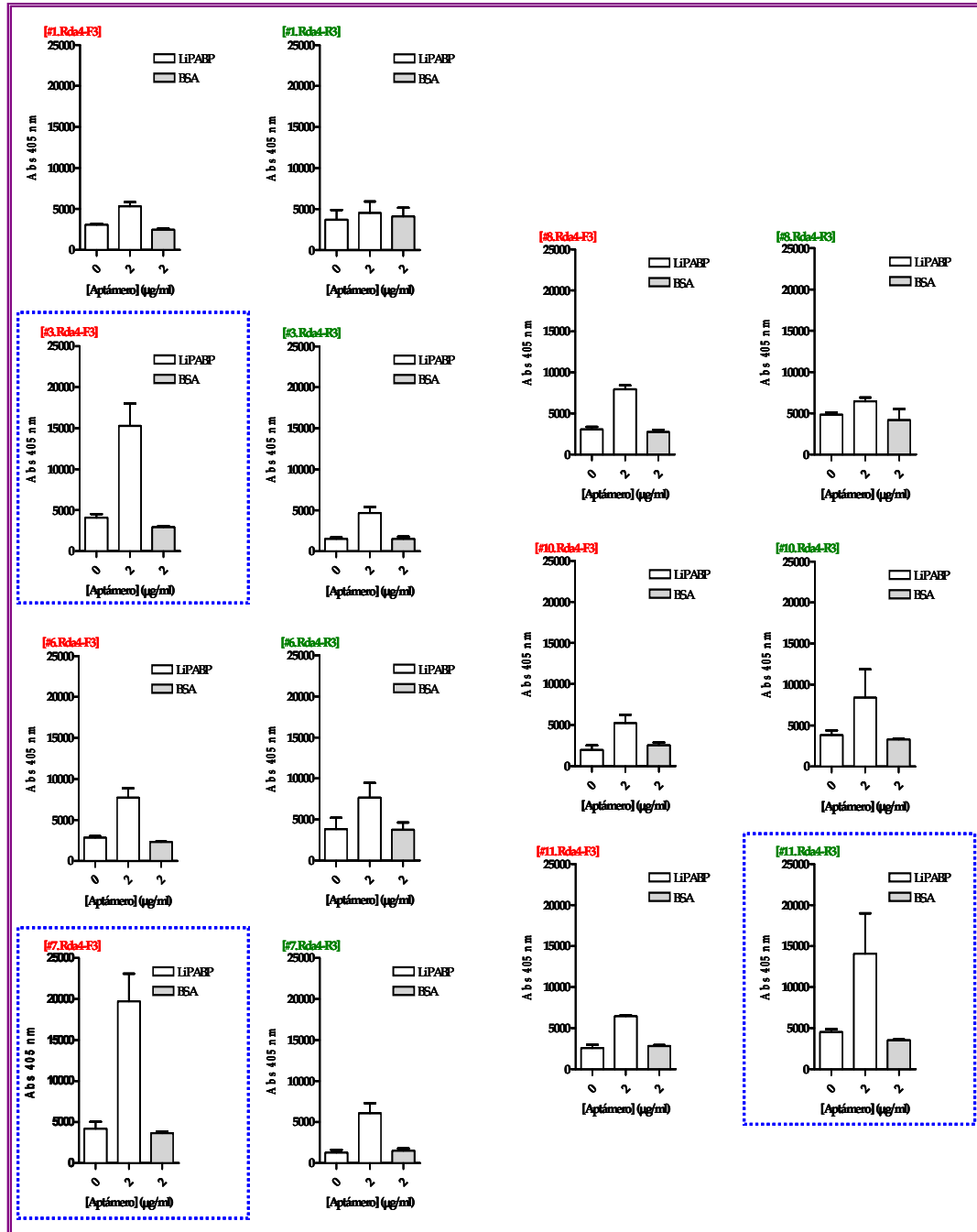


Figura 30. Capacidad de unión de la población inicial, SEL3LiPABP, SEL4LiPABP y clones obtenidos a partir de las poblaciones seleccionadas. Mediante E.L.O.N.A se han analizado la población inicial RND40, con las poblaciones seleccionadas SEL3LiPABP (A) y SEL4LiPABP (C), y los aptámeros procedentes de SEL3LiPABP (B) y SEL4LiPABP (D), todos ellos marcados con el cebador F3 5'-dig en color rojo y con el cebador R3 3'-dig en color verde. En todos los ensayos se dispusieron en placa 1 µg/pocillo (15,2 pmol) de LiPABP y de BSA utilizada como control negativo, y se incubaron con 2 µg/ml de la secuencia correspondiente de oligonucleótidos marcada. La Media \pm S.E.M es representada por los diagramas de barras correspondientes de dos experimentos independientes. El indicativo #; significa clon, Rda3; procedente de SEL3LiPABP, y Rda4; procedente de SEL4LiPABP. Las cajas azules delimitan los aptámeros con mejor interacción por LiPABP.

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se agrupó a los distintos aptámeros específicos en base a su afinidad por la proteína diana considerándose varios grupos. Los aptámeros que presentaban entre 3 y 4 veces mayor afinidad por LiPABP que la población los denominamos de afinidad alta, entre 2 y 3 veces, de afinidad media y entre 1 y 2 veces, de baja afinidad, el resto de los clones que no presenta casi interacción no han sido considerados. Aunque entre los aptámeros específicos se encuentran algunos procedentes de la ronda 3 y otros de la ronda 4, los mejores resultados se obtienen con los clones obtenidos después de 4 rondas de selección. Estos aptámeros fueron secuenciados y el resto fueron descartados.

Con objeto de identificar si existían motivos conservados entre los aptámeros de los distintos grupos de afinidad, se realizó un alineamiento múltiple mediante el programa CLUSTALW2 (Tabla 10) así como una cuantificación de la riqueza GC en cada uno de los grupos (Figura 31). Como puede observarse, no parecen existir motivos conservados, ni la riqueza en GC, que permite suponer diferencias en la estabilidad de las estructuras de los distintos aptámeros, correlaciona con la afinidad de los mismos.

Tabla 10. Grupos de afinidad de los aptámeros de SEL3LiPABP y SEL4LiPABP.

Afinidad	Aptámero	Secuencia de 40 nucleótidos (5'-3')
Alta	#3.Rda4-F3	GGACAGTTC-TACGAGGATTACGCTGTTACTAAGTGTGGGG
	#7.Rda4-F3	CCAGAGTGAACACAAAGAAATTGAAATACGTAAGCTCCGG-
	#11.Rda4-R3	GGCCCCCTCCTCCCTCCCCCAC-CCGACACTATTCCCCCCC
	Consenso	* **
Media	#3.Rda3-F3	GGCCCATTTGGTATGAAGTAATCCCGGAG--GTGAACCACGGG---
	#10.Rda3-F3	GGGTAGCTGGTATAATATAGCACCAGTGTGACGGTTCACG-----
	#12.Rda3-F3	----GTGGGGTATAACGCGCGGCATGAG--ATGGTCTGTACCTGG
	Consenso	***** * * * *
Baja	#4.Rda3-F3	--ACGGGCGAGTGGC-AGTGTTAGTTTCAAGAAGCTGTGGTTG
	#8.Rda3-F3	-TGCGGGCGTGCTC-AACATACTCTTGCCACCTCCACCGCC-
	#8.Rda4-F3	--AGTGGTGAACATTGAACATGTGCCATCTGGTGCC-TAGCC-
	#10.Rda4-R3	CCACCGATG-GCAAGGAGTGCGTGCTCACGGTTTGT-TGACCA
	Consenso	* * *

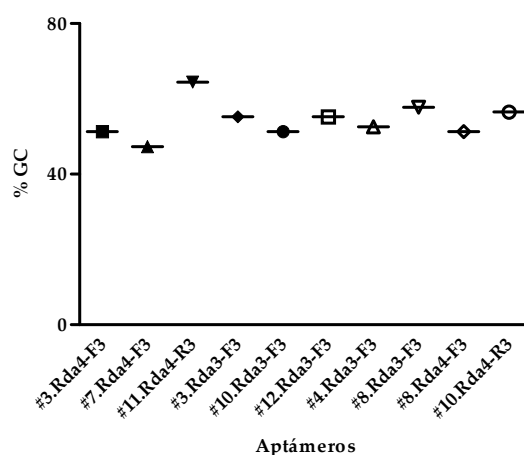


Figura 31. Porcentaje de bases GC de los aptámeros con afinidad por LiPABP. Representación gráfica de la proporción en bases GC que presentan los clones de alta, media y baja afinidad, por la proteína LiPABP.

4.5. Análisis de afinidad y secuencia-estructura de los aptámeros de alta afinidad

Aunque son muchos los aptámeros que reconocen significativamente LiPABP, decidimos continuar nuestro estudio con aquellos que habíamos considerado de alta afinidad (al menos 3 veces superior a la del control) y que son capaces de reconocer la proteína LiPABP con afinidades superiores al resto (#3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3). Hay que señalar, que dos de estos aptámeros tienen la orientación correspondiente a la población inicial (que hemos denominado F3) y el otro tiene la orientación inversa, lo que indica que corresponde a una secuencia complementaria producida durante una de las amplificaciones por PCR.

Con objeto de estudiar con más profundidad la afinidad de los clones seleccionados, se realizaron ensayos de E.L.O.N.A. y Slot Blot como se había hecho con la población seleccionada (Figura 32). Los resultados de E.L.O.N.A. indican que, de los 3 aptámeros analizados, #7.Rda4-F3 es el que muestra una mayor capacidad de reconocimiento de LiPABP. El mismo resultado se obtiene mediante Slot Blot.

Las estructuras de los aptámeros que mostraban mayor afinidad por LiPABP fueron obtenidas con el programa Mfold (Figura 33) y hemos considerado aquellas que mostraban una energía libre menor y, en consecuencia, eran más estables.

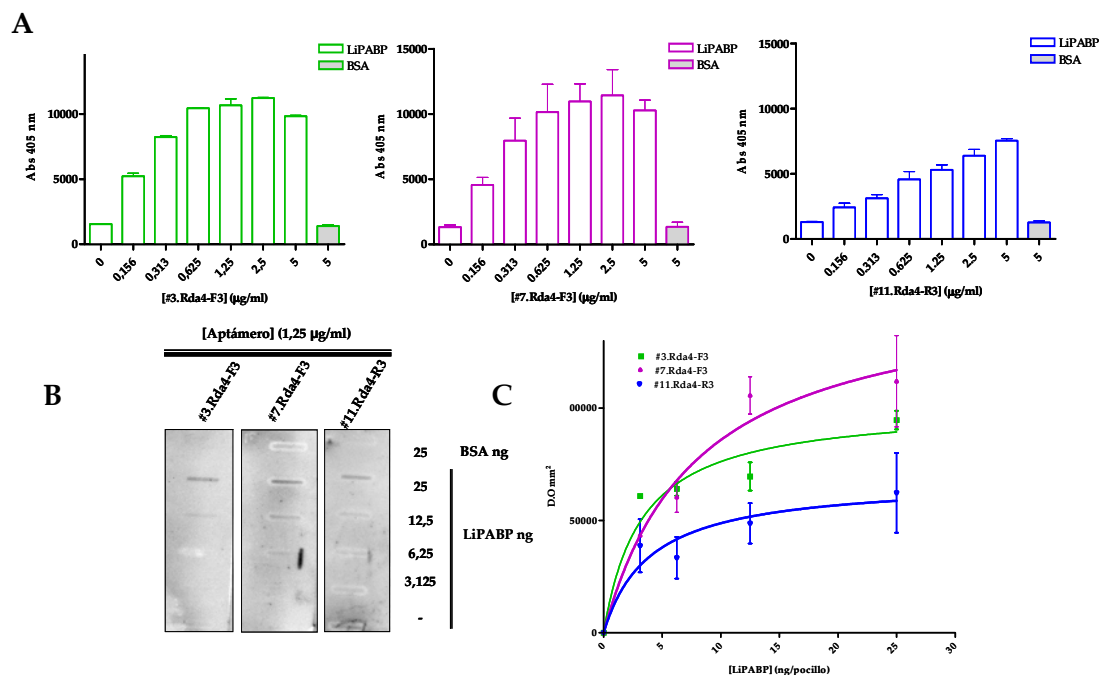
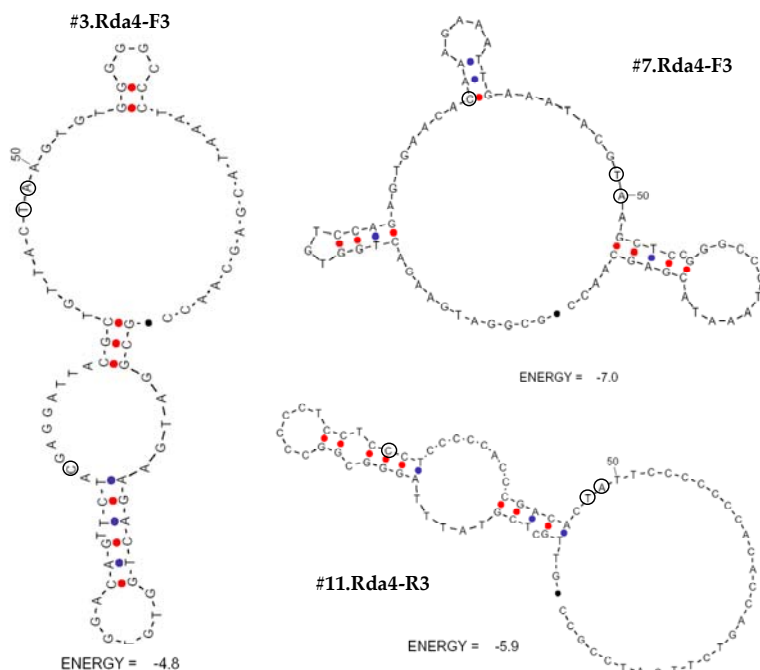


Figura 32. Análisis de la interacción con la proteína LiPABP de los aptámeros #3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3. (A) Mediante E.L.O.N.A. hemos estudiado la afinidad de los clones #3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3 seleccionados en los ensayos anteriores. La proteína dispuesta en placa a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/pocillo}$ (7,6 pmol) se ha incubado con los tres aptámeros marcados con digoxigenina, a concentraciones de 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5 $\mu\text{g/ml}$. Los diagramas de barras representan la Media \pm S.E.M. de dos experimentos. (B) Ensayos Slot Blot con concentraciones decrecientes de la proteína LiPABP de 25-3,125 ng/pocillo (378-47 fmol) y 25 ng/pocillo (378 fmol) de la proteína BSA como control negativo. La incubación con los aptámeros se realizó con 1,25 $\mu\text{g/ml}$. (C) Representación gráfica de la cuantificación Media \pm S.E.M de las bandas obtenidas de tres ensayos Slot Blot independientes.

Figura 33. Estructuras secundarias teóricas de los aptámeros #3.Rda4-F3, #7.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3. Las conformaciones se realizaron con el programa Mfold y se eligieron estructuras de menor energía libre de cada secuencia. Se indican con un círculo la localización de las posiciones consenso.



Como se muestra en la Figura 33, se observa cierta similitud entre las estructuras más estables obtenidas para los aptámeros #3.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3, mientras que la del aptámero #7.Rda4-F3 es bastante diferente. Así, los clones #3.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3 presentan varios tallo-bucle consecutivos similares, mientras que el clon #7.Rda4-F3 presenta un bucle central del que parten varias horquillas de menor tamaño. El motivo consenso TA, que se encuentra en los tres aptámeros, se localiza en los bucles mayores de cada clon, y la base C, que también la comparten los tres aptámeros, podría acercarse al motivo consenso TA en la estructura terciaria que adoptan los aptámeros.

De todos los resultados presentados anteriormente, se deduce que #7.Rda4-F3, que muestra una estructura diferente a la de los aptámeros #3.Rda4-F3 y #11.Rda4-R3, es el aptámero que presenta mayor afinidad por LiPABP. Aunque en este trabajo, hemos caracterizado en mayor profundidad el aptámero #7.Rda4-F3, no podemos descartar que el uso combinado de aptámeros seleccionados de una población enriquecida pueda ser más eficaz en terapia o como herramientas de diagnóstico.

4.6. Análisis de afinidad del clon SEL4LiPABP#7

En primer lugar, se hicieron ensayos de afinidad mediante E.L.O.N.A y Slot Blot del aptámero #7.Rda4-F3, que a partir de ahora denominaremos SEL4LiPABP#7, de la misma forma descrita para las poblaciones. En primer lugar, se realizaron ensayos de E.L.O.N.A en los que se dispusieron 0,5 µg/pocillo (7,6 pmol) de LiPABP y BSA, que se incubaron con concentraciones crecientes del aptámero SEL4LiPABP#7 y la población original RND40 (0,156-5 µg/ml) (Figura 34). Los resultados demuestran que el aptámero SEL4LiPABP#7 es capaz de detectar la proteína LiPABP recombinante de una forma dependiente de la concentración con mayor afinidad que la población inicial RND40.

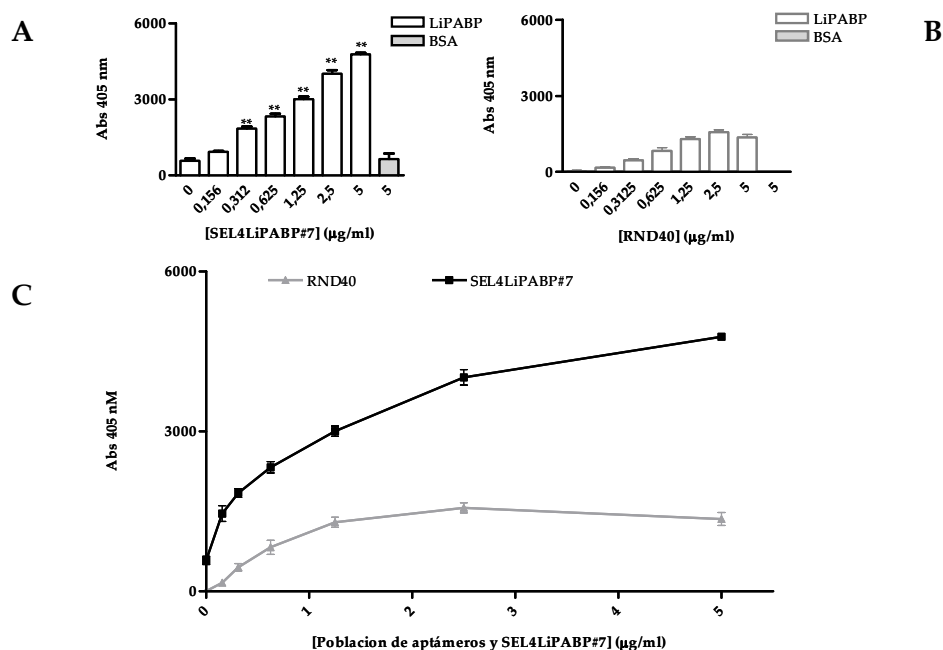


Figura 34. Comparativa de la interacción con la proteína diana del clon #7.Rda4-F3 y de la población inicial RND40. La capacidad de unión del aptámero individual y el conjunto de oligonucleótidos inicial se estudió mediante E.L.O.N.A. La proteína LiPABP dispuesta en placa a una concentración de 0,5 µg/pocillo (7,6 pmol) se incubó con diferentes concentraciones 0,156-5 µg/ml del clon SEL4LiPABP#7 (A) y RND40 marcados con digoxigenina (B). Los diagramas de barras representan la Media \pm S.E.M. de tres experimentos. Diferencias estadísticas entre cada valor de concentración de SEL4LiPABP#7 o RND40 y su valor de concentración 0 del aptámero y de la población original (**p < 0,01; ANOVA seguido de test de Dunnet). (C) Comparación de los valores de absorbancias del aptámero y la población.

Los siguientes ensayos permitieron establecer los límites de detección frente a LiPABP. Para ello, se realizaron dos grupos de ensayos de ELONA: en el primero de ellos, se incubaron 0,5 µg de la proteína LiPABP (7,6 pmol) o de BSA (7,6 pmol), con cantidades crecientes (0,156-5 µg/ml) de SEL4LiPABP#7 marcado con digoxigenina (Figura 35A) y, en el segundo, se variaron las cantidades de LiPABP y BSA entre 0,125 y 4 µg/pocillo (1,9-60,8 pmol) que se incubaron con una concentración de SEL4LiPABP#7 de 2 µg/ml (Figura 35B). Los resultados obtenidos se ajustan a una hipérbola que permite calcular la K_D de SEL4LiPABP#7 siendo igual a $0,5 \pm 3,6$ nM. Un análisis más detallado de estos datos, representados en los diagramas de barras de la Figura 35A, permite concluir que una concentración tan baja como 0,312 µg/ml de SEL4LiPABP#7 es capaz de detectar 0,5 µg (7,6 pmol) de LiPABP de manera

significativa. Del mismo modo una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ es capaz de detectar significativamente 0,25 μg de proteína ($R^2 = 0,925$; $p < 0,0001$) (Figura 35B).

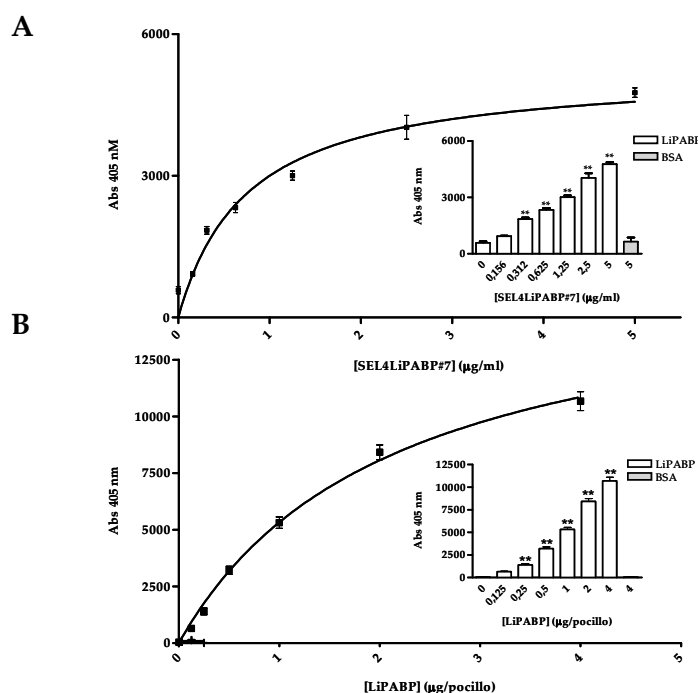


Figura 35. Límites en la capacidad de unión del clon SEL4LiPABP#7. Representaciones de los resultados obtenidos mediante E.L.O.N.A. (A) Varias concentraciones de SEL4LiPABP#7 marcado con digoxigenina entre 0,156 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se incubaron con LiPABP dispuesta en placa a 0,5 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ (7,6 pmol), y (B) donde la proteína recombinante LiPABP se dispuso en placa en diferentes concentraciones 0,125-4 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ (1,9-60,8 pmol) y se incubó con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del SEL4LiPABP#7 marcado con digoxigenina. En ambos ensayos se utilizó la proteína BSA como control negativo. Los datos se han ajustado a una función de curva hipérbola y se muestran los datos como diagramas de barras que representan la Media \pm S.E.M. de tres experimentos independientes. Diferencias estadísticas entre cada valor de concentración de SEL4LiPABP#7 (A) o LiPABP (B) y su valor de concentración 0 de población de aptámeros o de proteína respectivamente (** $p < 0,01$; ANOVA seguido de un test de Dunnet).

Por otra parte, se realizaron ensayos de Slot Blot como anteriormente y los resultados obtenidos (Figura 36) muestran que SEL4LiPABP#7 a una concentración de 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ es capaz de detectar 6,25 ng (95 fmol) de LiPABP y no reconoce la proteína control BSA.

En conclusión, hemos identificado y caracterizado molecularmente un aptámero, denominado SEL4LiPABP#7, que es capaz de detectar LiPABP con muy alta afinidad tanto por E.L.O.N.A. como por Slot Blot.

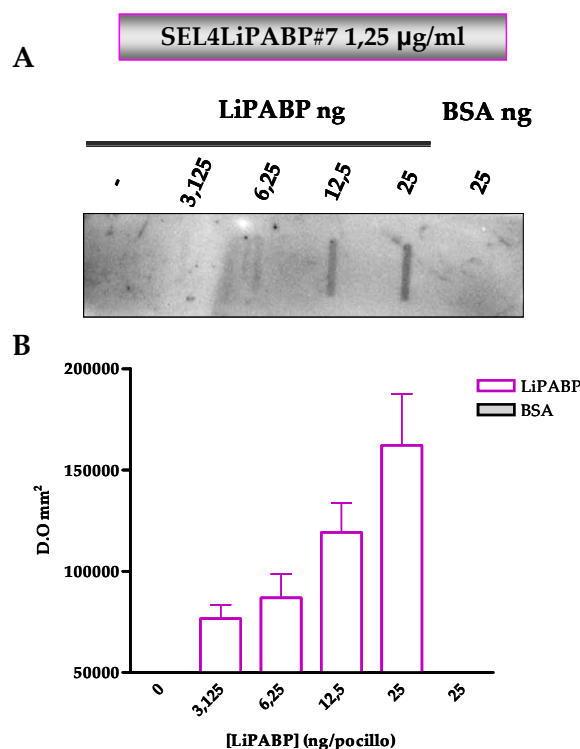


Figura 36. Límites de reconocimiento por Slot Blot del aptámero SEL4LiPABP#7 sobre la proteína LiPABP. Mediante ensayos Slot Blot (A) hemos evaluado la capacidad de unión de 1,25 µg del aptámero seleccionado a la proteína LiPABP, dispuesta en concentraciones crecientes de 3,125-25 ng/pocillo (378-47 fmol) y a 25 ng (378 fmol) de la proteína BSA utilizada como control negativo. (B) Diagramas de barras que representan la cuantificación Media \pm S.E.M de la banda obtenida de dos ensayos Slot Blot independientes.

4.7. Estudio de especificidad del clon SEL4LiPABP#7. Aptapurificación

Una vez demostrado que SEL4LiPABP#7 se une con elevada afinidad a su proteína diana, decidimos analizar si también es capaz de retener específicamente LiPABP expresada en células HEK293T y, así, intentar utilizarlo como molécula de biorreconocimiento en un sistema de purificación de proteínas. Para ello, el aptámero marcado con biotina en su extremo 5' fue incubado con un lisado de células HEK293T que sobreexpresaban la proteína LiPABP fusionada al epítipo Flag. En paralelo, se utilizó la población RND40 marcada con biotina. Posteriormente, se añadió una resina conjugada con estreptavidina de forma que los complejos LiPABP:SEL4LiPABP#7 quedasen retenidos por la resina. Por último, los complejos fueron resueltos y analizados mediante SDS-PAGE utilizando un anticuerpo anti-Flag.

Como se observa en la Figura 37, el anticuerpo anti-Flag detecta LiPABP en el carril correspondiente a lisados incubados con SEL4LiPABP#7 y, en mucha menor medida, en los lisados incubados con RND40. Estos resultados demuestran claramente que SEL4LiPABP#7 tiene una capacidad de retener de forma específica LiPABP considerablemente mayor que la población RND40. Además, el hecho de que SEL4LiPABP#7 pueda utilizarse para la purificación específica de la proteína LiPABP,

confirma la posibilidad de que aptámeros específicos puedan utilizarse para purificar otras proteínas a partir de extractos celulares o mezclas complejas.

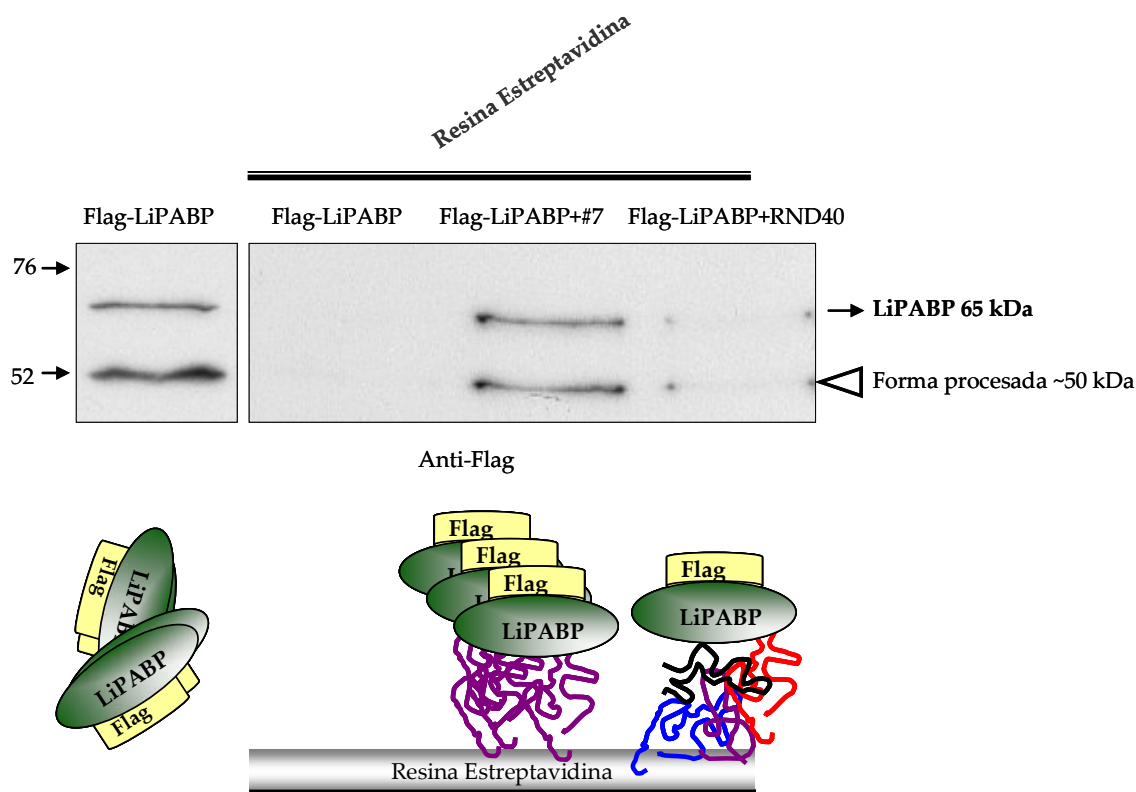
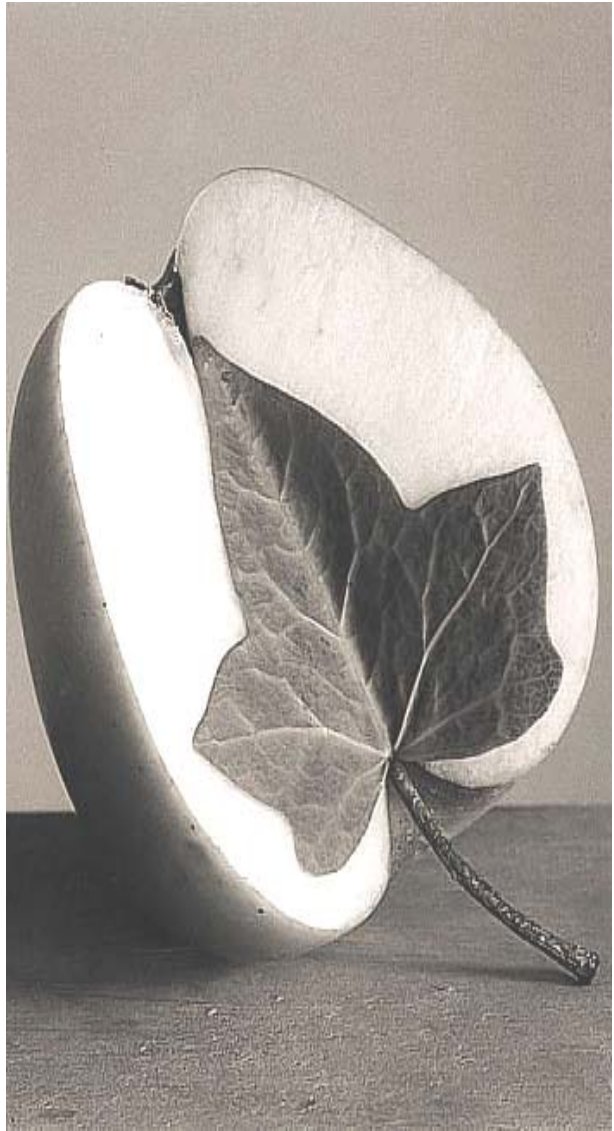


Figura 37. Especificidad del aptámero SEL4LiPABP#7. Mediante ensayos de purificación con resina estreptavidina y tal y como se describe en *Material y Métodos*, se analizó mediante SDS-PAGE (10%) la capacidad de 16 µg/ml de aptámero SEL4LiPABP#7 (Flag-LiPABP+#7) y de RND40 (Flag-LiPABP+RND40) marcados con biotina, para discriminar entre LiPABP sobreexpresada y otras proteínas presentes en un lisado celular (55 µg) de la línea HEK293T (Flag-LiPABP). La proteína LiPABP es detectada con anticuerpos anti-Flag y se muestra una membrana representativa de varios ensayos. En el dibujo se presenta una modelización del ensayo.

Existen aptámeros que son capaces de unir con elevada afinidad proteínas de tan sólo 10 kDa (Qiu y col., 2010; Stanlis y McIntosh, 2003) y, acoplados a biosensores, son capaces de detectarlas en muestras de sueros (Lee y col., 2008) o soluciones biológicas donde estas dianas se encuentran en pequeñas concentraciones (Johnson y col., 2008). Esta capacidad de detección se aplica en diferentes campos como, por ejemplo, en la detección de *L. monocytogenes* en alimentos (Ohk y col., 2010) o de células infectadas con ciertos virus (Tang y col., 2009). También se han utilizado combinaciones de diferentes aptámeros que detectan microorganismos como *E. coli* (Lee y col., 2009) y *S.*

Resultados y Discusión

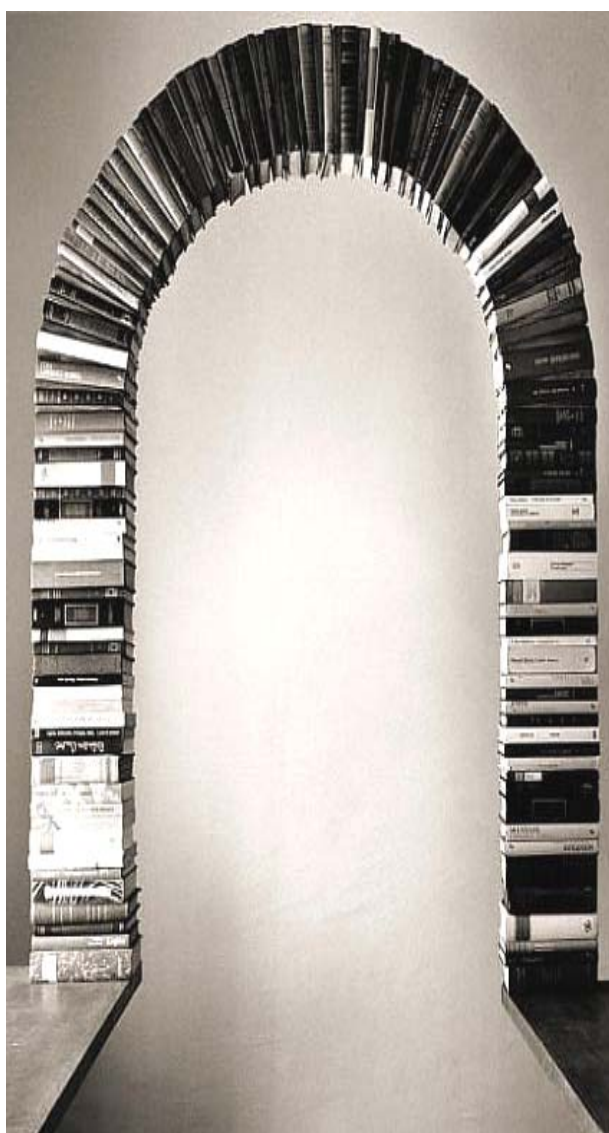
aureus (Cao y col., 2009) en diferentes fluidos. La acción combinada de 5 aptámeros frente a *S. aureus* ha resultado más eficaz en líquidos biológicos de pacientes, en cuanto a afinidad y especificidad de detección, que el uso de cada uno de ellos de forma individual.



CONCLUSIONES

El fin de una cosa, es el inicio de otra
Anenita

1. Hemos identificado una nueva proteína de unión a la cola poli(A) de *Leishmania infantum* (LiPABP) que presenta una alta homología estructural con las PABPs de diferentes especies, conservando los cuatros dominios de unión a ARN (RRMs) y el dominio único de proteína PABP (PABC). Además, LiPABP mantiene la capacidad de unión a secuencias de poli(A), principal característica de todas las PABPs.
2. La proteína LiPABP es capaz de generar respuesta inmune en perros infectados con *L. infantum*. A partir de los sueros de estos animales, hemos purificado anticuerpos policlonales que reconocen la proteína LiPABP recombinante (sobreexpresada en bacterias o en células de mamífero) y nos han permitido identificar la proteína endógena de *Leishmania infantum* en el propio parásito.
3. Hemos aislado y caracterizado molecular y estructuralmente una serie de aptámeros que reconocen, con afinidad en el rango nM y alta especificidad, a la proteína LiPABP. De entre ellos, hemos seleccionado un aptámero, denominado SEL4LiPABP#7, que permite purificar la proteína LiPABP de forma altamente específica.



BIBLIOGRAFÍA

*Cuando llegues al final de lo que debes saber,
estarás al principio de lo que debes sentir*
Khalil Gibran

- Abbott C. M. y Proud C. G. (2004) Translation factors: in sickness y in health. *Trends Biochem Sci* 29, 25-31.
- Adam S. A., Nakagawa T., Swanson M. S., Woodruff T. K. y Dreyfuss G. (1986) mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation y sequencing y identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* 6, 2932-2943.
- Afonina E., Stauber R. y Pavlakis G. N. (1998) The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus y the cytoplasm. *J Biol Chem* 273, 13015-13021.
- Agabian N. (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61, 1157-1160.
- Akopyants N. S., Kimblin N., Secundino N., Patrick R., Peters N., Lawyer P., Dobson D. E., Beverley S. M. y Sacks D. L. (2009) Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324, 265-268.
- Alexander J., Satoskar A. R. y Russell D. G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Antoine J. C., Prina E., Lang T. y Courret N. (1998) The biogenesis y properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6, 392-401.
- Aransay A. M., Testa J. M., Morillas-Marquez F., Lucientes J. y Ready P. D. (2004) Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain. *Parasitol Res* 94, 416-420.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Ayllon T., Tesouro M. A., Amusatogui I., Villaescusa A., Rodriguez-Franco F. y Sainz A. (2008) Serologic y molecular evaluation of *Leishmania infantum* in cats from Central Spain. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 361-364.
- Bae E., Reiter N. J., Bingman C. A., Kwan S. S., Lee D., Phillips G. N., Jr., Butcher S. E. y Brow D. A. (2007) Structure y interactions of the first three RNA recognition motifs of splicing factor prp24. *J Mol Biol* 367, 1447-1458.
- Baer B. W. y Kornberg R. D. (1980) Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1890-1892.
- Baer B. W. y Kornberg R. D. (1983) The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* 96, 717-721.

- Bagalkot V., Farokhzad O. C., Langer R. y Jon S. (2006) An aptamer-doxorubicin physical conjugate as a novel targeted drug-delivery platform. *Angew Chem Int Ed Engl* 45, 8149-8152.
- Bangs J. D., Crain P. F., Hashizume T., McCloskey J. A. y Boothroyd J. C. (1992) Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 267, 9805-9815.
- Barhoumi M., Tanner N. K., Banroques J., Linder P. y Guizani I. (2006) Leishmania infantum LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase y an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *Febs J* 273, 5086-5100.
- Bates E. J., Knuepfer E. y Smith D. F. (2000) Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis y localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 28, 1211-1220.
- Bates P. A. (2007) Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37, 1097-1106.
- Batista J. A., Teixeira S. M., Donelson J. E., Kirchhoff L. V. y de Sa C. M. (1994) Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein y its genes. *Mol Biochem Parasitol* 67, 301-312.
- Bedford M. T. y Richard S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* 18, 263-272.
- Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J. P., Sloof P., Van Boom J. H. y Tromp M. C. (1986) Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* 46, 819-826.
- Benoit B., Nemeth A., Aulner N., Kuhn U., Simonelig M., Wahle E. y Bourbon H. M. (1999) The Drosophila poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout Drosophila development y has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog in vitro. *Nucleic Acids Res* 27, 3771-3778.
- Benz C., Nilsson D., Andersson B., Clayton C. y Guilbride D. L. (2005) Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol* 143, 125-134.
- Berens C., Thain A. y Schroeder R. (2001) A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* 9, 2549-2556.
- Bhattacharyya S. N., Chatterjee S. y Adhya S. (2002) Mitochondrial RNA import in Leishmania tropica: aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. *Mol Cell Biol* 22, 4372-4382.

- Blobel G. (1973) A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70, 924-928.
- Bollig F., Winzen R., Gaestel M., Kostka S., Resch K. and Holtmann H. (2003) Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 665-670.
- Bonderoff J. M., Larey J. L. y Lloyd R. E. (2008) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C proteinase inhibits viral internal ribosome entry site-mediated translation. *J Virol* 82, 9389-9399.
- Boucher N., Wu Y., Dumas C., Dube M., Sereno D., Breton M. y Papadopoulou B. (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277, 19511-19520.
- Bradford M. M. (1976) A rapid y sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brais B., Bouchard J. P., Xie Y. G., Rochefort D. L., Chretien N., Tome F. M., Lafreniere R. G., Rommens J. M., Uyama E., Nohira O., Blumen S., Korczyn A. D., Heutink P., Mathieu J., Duranceau A., Codere F., Fardeau M. y Rouleau G. A. (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18, 164-167.
- Brand S. F., Pichoff S., Noselli S. y Bourbon H. M. (1995) Novel *Drosophila melanogaster* genes encoding RRM-type RNA-binding proteins identified by a degenerate PCR strategy. *Gene* 154, 187-192.
- Britto C., Ravel C., Bastien P., Blaineau C., Pages M., Dedet J. P. y Wincker P. (1998) Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World y New World *Leishmania* genomes. *Gene* 222, 107-117.
- Bulle B., Millon L., Bart J. M., Gallego M., Gambarelli F., Portus M., Schnur L., Jaffe C. L., Fernandez-Barredo S., Alunda J. M. y Piarroux R. (2002) Practical approach for typing strains of *Leishmania infantum* by microsatellite analysis. *J Clin Microbiol* 40, 3391-3397.
- Burd C. G., Matunis E. L. y Dreyfuss G. (1991) The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* 11, 3419-3424.
- Bushell M., Wood W., Carpenter G., Pain V. M., Morley S. J. y Clemens M. J. (2001) Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic

- initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- γ viral protease-mediated cleavages. *J Biol Chem* 276, 23922-23928.
- Callaghan M. J., Russell A. J., Woollatt E., Sutherland G. R., Sutherland R. L. y Watts C. K. (1998) Identification of a human HECT family protein with homology to the *Drosophila* tumor suppressor gene hyperplastic discs. *Oncogene* 17, 3479-3491.
- Campos-Neto A., Webb J. R., Greeson K., Coler R. N., Skeiky Y. A. y Reed S. G. (2002) Vaccination with plasmid DNA encoding TSA/LmSTI1 leishmanial fusion proteins confers protection against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 70, 2828-2836.
- Cao X., Li S., Chen L., Ding H., Xu H., Huang Y., Li J., Liu N., Cao W., Zhu Y., Shen B. y Shao N. (2009) Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 37, 4621-4628.
- Carrion J., Nieto A., Soto M. y Alonso C. (2007) Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Microbes Infect* 9, 735-743.
- Chang K. P. (1983) Cellular y molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int Rev Cytol Suppl* 14, 267-305.
- Chang L. y Karin M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chang T. C., Yamashita A., Chen C. Y., Yamashita Y., Zhu W., Durdan S., Kahvejian A., Sonenberg N. y Shyu A. B. (2004) UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev* 18, 2010-2023.
- Chen C. Y., Gherzi R., Ong S. E., Chan E. L., Raijmakers R., Pruijn G. J., Stoecklin G., Moroni C., Mann M. y Karin M. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464.
- Chen F., Zhou J., Luo F., Mohammed A. B. y Zhang X. L. (2007) Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 743-748.
- Chrestensen C. A., Schroeder M. J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Pelo J. W., Worthington M. T. y Sturgill T. W. (2004) MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 279, 10176-10184.
- Chu T. C., Twu K. Y., Ellington A. D. y Levy M. (2006a) Aptamer mediated siRNA delivery. *Nucleic Acids Res* 34, e73.

- Chu T. C., Marks J. W., 3rd, Lavery L. A., Faulkner S., Rosenblum M. G., Ellington A. D. y Levy M. (2006b) Aptamer:toxin conjugates that specifically target prostate tumor cells. *Cancer Res* 66, 5989-5992.
- Clark A. R., Dean J. L. y Saklatvala J. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett* 546, 37-44.
- Clayton C. y Shapira M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes y leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156, 93-101.
- Clayton C. E. (2002) Life without transcriptional control? From fly to man y back again. *Embo J* 21, 1881-1888.
- Clery A., Blatter M. y Allain F. H. (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18, 290-298.
- Cox F. E. (2002) History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 15, 595-612.
- Craig A. W., Haghighat A., Yu A. T. y Sonenberg N. (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520-523.
- Cruz I., Morales M. A., Noguer I., Rodriguez A. y Alvar J. (2002) Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet* 359, 1124-1125.
- Davidson, R.N. in *Infections Diseases*, 2nd ed (eds. Cohen, J & Powderly, W.G.) Chapter 172. p1621-1625 (Edinburgh, Mosby, 2004)
- de Carvalho L. P., Soto M., Jeronimo S., Dondji B., Bacellar O., Luz V., Orge Orge G., Alonso C., Jesus A. R. y Carvalho E. M. (2003) Characterization of the immune response to Leishmania infantum recombinant antigens. *Microbes Infect* 5, 7-12.
- de Melo Neto O. P., Standart N. y Martins de Sa C. (1995) Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 23, 2198-2205.
- Dean J. L., Sarsfield S. J., Tsounakou E. y Saklatvala J. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase stabilizes mRNAs that contain cyclooxygenase-2 y tumor necrosis factor AU-rich elements by inhibiting deadenylation. *J Biol Chem* 278, 39470-39476.
- Dean J. L., Sully G., Clark A. R. y Saklatvala J. (2004) The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* 16, 1113-1121.
- Deardorff J. A. y Sachs A. B. (1997) Differential effects of aromatic y charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* 269, 67-81.

- Deo R. C., Sonenberg N. y Burley S. K. (2001) X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4414-4419.
- Deo R. C., Bonanno J. B., Sonenberg N. y Burley S. K. (1999) Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98, 835-845.
- Desjeux P. y Alvar J. (2003) Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1, 3-15.
- Dhalia R., Reis C. R., Freire E. R., Rocha P. O., Katz R., Muniz J. R., Standart N. y de Melo Neto O. P. (2005) Translation initiation in Leishmania major: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140, 23-41.
- Dizin E., Gressier C., Magnard C., Ray H., Decimo D., Ohlmann T. y Dalla Venezia N. (2006) BRCA1 interacts with poly(A)-binding protein: implication of BRCA1 in translation regulation. *J Biol Chem* 281, 24236-24246.
- Drawbridge J., Grainger J. L. y Winkler M. M. (1990) Identification y characterization of the poly(A)-binding proteins from the sea urchin: a quantitative analysis. *Mol Cell Biol* 10, 3994-4006.
- Dreyfuss G. (1986) Structure y function of nuclear y cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu Rev Cell Biol* 2, 459-498.
- Ellington A. D. y Szostak J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.
- El-On J. (2009) Current status y perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Isr Med Assoc J* 11, 623-628.
- Erllich H. A. (1989) Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol* 9, 437-447.
- Farabaugh P. J. (1978) Sequence of the lacI gene. *Nature* 274, 765-769.
- Feliciangeli M. D. (2004) Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol* 18, 71-80.
- Fernandez-Bellon H., Solano-Gallego L., Bardagi M., Alberola J., Ramis A. y Ferrer L. (2006) Immune response to Leishmania infantum in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol* 135, 181-185.
- Folgueira C., Martinez-Bonet M. y Requena J. M. (2010) The Leishmania infantum PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. *BMC Res Notes* 3, 13.

- Folgueira C., Quijada L., Soto M., Abanades D. R., Alonso C. y Requena J. M. (2005) The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem* 280, 35172-35183.
- Folgueira C., Carrion J., Moreno J., Saugar J. M., Canavate C. y Requena J. M. (2008) Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth, morphology, y virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. *Int Microbiol* 11, 81-89.
- Ford L. P., Bagga P. S. y Wilusz J. (1997) The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. *Mol Cell Biol* 17, 398-406.
- Fukami-Kobayashi K., Tomoda S. y Go M. (1993) Evolutionary clustering y functional similarity of RNA-binding proteins. *FEBS Lett* 335, 289-293.
- Galvez R., Miro G., Descalzo M. A., Nieto J., Dado D., Martin O., Cubero E. y Molina R. (2010b) Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol* 169, 327-334.
- Galvez R., Descalzo M. A., Miro G., Jimenez M. I., Martin O., Dos Santos-Brandao F., Guerrero I., Cubero E. y Molina R. (2010a) Seasonal trends y spatial relations between environmental/meteorological factors y leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop*.
- Gebauer F. y Hentze M. W. (2007) Studying translational control in *Drosophila* cell-free systems. *Methods Enzymol* 429, 23-33.
- Gingras A. C., Raught B. y Sonenberg N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes y regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68, 913-963.
- Goto Y., Carter D. y Reed S. G. (2008) Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. *Infect Immun* 76, 3967-3974.
- Goto Y., Coler R. N., Guderian J., Mohamath R. y Reed S. G. (2006) Cloning, characterization, y serodiagnostic evaluation of *Leishmania infantum* tandem repeat proteins. *Infect Immun* 74, 3939-3945.
- Goto Y., Bhatia A., Raman V. S., Vidal S. E., Bertholet S., Coler R. N., Howard R. F. y Reed S. G. (2009) *Leishmania infantum* sterol 24-c-methyltransferase formulated with MPL-SE induces cross-protection against *L. major* infection. *Vaccine* 27, 2884-2890.
- Grange T., de Sa C. M., Oddos J. y Pictet R. (1987) Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif. *Nucleic Acids Res* 15, 4771-4787.

- Grate D. y Wilson C. (2001) Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex. *Bioorg Med Chem* 9, 2565-2570.
- Gray N. K., Collier J. M., Dickson K. S. y Wickens M. (2000) Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *Embo J* 19, 4723-4733.
- Green R., Ellington A. D. y Szostak J. W. (1990) In vitro genetic analysis of the Tetrahymena self-splicing intron. *Nature* 347, 406-408.
- Groft C. M. y Burley S. K. (2002) Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol Cell* 9, 1273-1283.
- Grosset C., Chen C. Y., Xu N., Sonenberg N., Jacquemin-Sablon H. y Shyu A. B. (2000) A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail y a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* 103, 29-40.
- Gurunathan S., Sacks D. L., Brown D. R., Reiner S. L., Charest H., Glaichenhaus N. y Seder R. A. (1997) Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 186, 1137-1147.
- Haile S. y Papadopoulou B. (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10, 569-577.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hannaert V., Bringaud F., Oppendoes F. R. y Michels P. A. (2003) Evolution of energy metabolism y its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11.
- Harb M., Becker M. M., Vitour D., Baron C. H., Vende P., Brown S. C., Bolte S., Arold S. T. y Poncet D. (2008) Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G y RoXaN. *J Virol* 82, 11283-11293.
- Hecker H. y Gander E. S. (1985) The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. *Biol Cell* 53, 199-208.
- Hermann T. y Patel D. J. (2000) Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 287, 820-825.
- Herwaldt B. L. (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Hinnebusch A. G. (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci* 31, 553-562.

- Hofmann H. P., Limmer S., Hornung V. y Sprinzl M. (1997) Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop y a G-A base pair. *Rna* 3, 1289-1300.
- Hoft D. F., Kim K. S., Otsu K., Moser D. R., Yost W. J., Blumin J. H., Donelson J. E. y Kirchhoff L. V. (1989) Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 57, 1959-1967.
- Holcik M. y Sonenberg N. (2005) Translational control in stress y apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327.
- Homann M. y Goringe H. U. (2001) Uptake y intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic "piggy-back" approach. *Bioorg Med Chem* 9, 2571-2580.
- Homann M., Lorger M., Engstler M., Zacharias M. y Goringe H. U. (2006) Serum-stable RNA aptamers to an invariant surface domain of live African trypanosomes. *Comb Chem High Throughput Screen* 9, 491-499.
- Hoshino S., Hosoda N., Araki Y., Kobayashi T., Uchida N., Funakoshi Y. y Katada T. (1999) Novel function of the eukaryotic polypeptide-chain releasing factor 3 (eRF3/GSPT) in the mRNA degradation pathway. *Biochemistry (Mosc)* 64, 1367-1372.
- Hotchkiss T. L., Nerantzakis G. E., Dills S. C., Shang L. y Read L. K. (1999) Trypanosoma brucei poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, y binding to 5 untranslated region sequence elements. *Mol Biochem Parasitol* 98, 117-129.
- Huang J. y Van der Ploeg L. H. (1991) Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *Embo J* 10, 3877-3885.
- Huibregtse J. M., Scheffner M., Beaudenon S. y Howley P. M. (1995) A family of proteins structurally y functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2563-2567.
- Ivanov P. V., Gehring N. H., Kunz J. B., Hentze M. W. y Kulozik A. E. (2008) Interactions between UPF1, eRFs, PABP y the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *Embo J* 27, 736-747.
- Ivens A. C., Lewis S. M., Bagherzadeh A., Zhang L., Chan H. M. y Smith D. F. (1998) A physical map of the Leishmania major Friedlin genome. *Genome Res* 8, 135-145.
- Jenison R. D., Gill S. C., Pardi A. y Polisky B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 263, 1425-1429.

- Joachims M., Van Breugel P. C. y Lloyd R. E. (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virol* 73, 718-727.
- Johnson S., Evans D., Laurenson S., Paul D., Davies A. G., Ferrigno P. K. y Walti C. (2008) Surface-immobilized peptide aptamers as probe molecules for protein detection. *Anal Chem* 80, 978-983.
- Julia V., Rassoulzadegan M. y Glaichenhaus N. (1996) Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 274, 421-423.
- Kahvejian A., Svitkin Y. V., Sukarieh R., M'Boutchou M. N. y Sonenberg N. (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19, 104-113.
- Kapp L. D. y Lorsch J. R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73, 657-704.
- Kenan D. J., Query C. C. y Keene J. D. (1991) RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 16, 214-220.
- Kerekatte V., Keiper B. D., Badorff C., Cai A., Knowlton K. U. y Rhoads R. E. (1999) Cleavage of Poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro y in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virol* 73, 709-717.
- Kessler S. H. y Sachs A. B. (1998) RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18, 51-57.
- Khacho M., Mekhail K., Pilon-Larose K., Pause A., Cote J. y Lee S. (2008) eEF1A is a novel component of the mammalian nuclear protein export machinery. *Mol Biol Cell* 19, 5296-5308.
- Khaleghpour K., Svitkin Y. V., Craig A. W., DeMaria C. T., Deo R. C., Burley S. K. y Sonenberg N. (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol Cell* 7, 205-216.
- Khanam T., Muddashetty R. S., Kahvejian A., Sonenberg N. y Brosius J. (2006) Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 y 3+4. *RNA Biol* 3, 170-177.
- Khoshgoo N., Zahedifard F., Azizi H., Taslimi Y., Alonso M. J. y Rafati S. (2008) Cysteine proteinase type III is protective against *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice y highly antigenic in visceral leishmaniasis individuals. *Vaccine* 26, 5822-5829.

- Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L. y Schwede T. (2009) The SWISS-MODEL Repository y associated resources. *Nucleic Acids Res* 37, D387-392.
- Kozak M. (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108, 229-241.
- Kozlov G., Menade M., Rosenauer A., Nguyen L. y Gehring K. (2010) Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* 397, 397-407.
- Kozlov G., Trempe J. F., Khaleghpour K., Kahvejian A., Ekiel I. y Gehring K. (2001) Structure y function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4409-4413.
- Kozlov G., Siddiqui N., Coillet-Matillon S., Trempe J. F., Ekiel I., Sprules T. y Gehring K. (2002) Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 277, 22822-22828.
- Kozlov G., De Crescenzo G., Lim N. S., Siddiqui N., Fantus D., Kahvejian A., Trempe J. F., Elias D., Ekiel I., Sonenberg N., O'Connor-McCourt M. y Gehring K. (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein y a HECT ubiquitin ligase. *Embo J* 23, 272-281.
- Kozlov G., Menade M., Rosenauer A., Nguyen L. and Gehring K. Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* 397, 397-407.
- Kuhn U. y Wahle E. (2004) Structure y function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678, 67-84.
- Kuhn U. and Pieler T. (1996) *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J Mol Biol* 256, 20-30.
- Kuyumcu-Martinez N. M., Joachims M. y Lloyd R. E. (2002) Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virol* 76, 2062-2074.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane R. P. (1991) The contribution of sandfly control to leishmaniasis control. *Ann Soc Belg Med Trop* 71 Suppl 1, 65-74.
- Lasa M., Mahtani K. R., Finch A., Brewer G., Saklatvala J. y Clark A. R. (2000) Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol* 20, 4265-4274.

- Law M. J., Rice A. J., Lin P. y Laird-Offringa I. A. (2006) The role of RNA structure in the interaction of U1A protein with U1 hairpin II RNA. *Rna* 12, 1168-1178.
- Le H., Tanguay R. L., Balasta M. L., Wei C. C., Browning K. S., Metz A. M., Goss D. J. y Gallie D. R. (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G y eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein y increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* 272, 16247-16255.
- LeBowitz J. H., Smith H. Q., Rusche L. y Beverley S. M. (1993) Coupling of poly(A) site selection y trans-splicing in Leishmania. *Genes Dev* 7, 996-1007.
- Lee H. J., Kim B. C., Kim K. W., Kim Y. K., Kim J. y Oh M. K. (2009) A sensitive method to detect Escherichia coli based on immunomagnetic separation y real-time PCR amplification of aptamers. *Biosens Bioelectron* 24, 3550-3555.
- Lee J. y Bedford M. T. (2002) PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO Rep* 3, 268-273.
- Lee J. Y., Kambe M., Hayashi M. y Takenaga K. (1998) Cloning y characterization of a novel zinc finger protein that associates with nuclear matrix. *DNA Cell Biol* 17, 849-858.
- Lee S. J., Youn B. S., Park J. W., Niazi J. H., Kim Y. S. y Gu M. B. (2008) ssDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes. *Anal Chem* 80, 2867-2873.
- Lee Y. J. y Glaunsinger B. A. (2009) Aberrant herpesvirus-induced polyadenylation correlates with cellular messenger RNA destruction. *PLoS Biol* 7, e1000107.
- Lefrere V. y Duncan R. F. (1994) Heat shock-induced repression of proteolysis: poly(A)-binding protein degradation patterns can illusorily suggest its specific loss during heat shock. *Nucleic Acids Res* 22, 1640-1642.
- Letunic I., Doerks T. y Bork P. (2009) SMART 6: recent updates y new developments. *Nucleic Acids Res* 37, D229-232.
- Lewdorowicz M., Yoffe Y., Zuberek J., Jemielity J., Stepinski J., Kierzek R., Stolarski R., Shapira M. y Darzynkiewicz E. (2004) Chemical synthesis y binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *Rna* 10, 1469-1478.
- Liang X. H., Haritan A., Uliel S. y Michaeli S. (2003) trans y cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, y regulation. *Eukaryot Cell* 2, 830-840.
- Liss M., Petersen B., Wolf H. y Prohaska E. (2002) An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Anal Chem* 74, 4488-4495.

- Lukes J., Mauricio I. L., Schonian G., Dujardin J. C., Soteriadou K., Dedet J. P., Kuhls K., Tintaya K. W., Jirku M., Chocholova E., Haralambous C., Pratlong F., Obornik M., Horak A., Ayala F. J. y Miles M. A. (2007) Evolutionary y geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9375-9380.
- Mair G., Shi H., Li H., Djikeng A., Aviles H. O., Bishop J. R., Falcone F. H., Gavrilescu C., Montgomery J. L., Santori M. I., Stern L. S., Wang Z., Ullu E. y Tschudi C. (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna* 6, 163-169.
- Mallikaratchy P., Tang Z., Kwame S., Meng L., Shangguan D. y Tan W. (2007) Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Proteomics* 6, 2230-2238.
- Mangus D. A., Evans M. C. and Jacobson A. (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4, 223.
- Maris C., Dominguez C. y Allain F. H. (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* 272, 2118-2131.
- Marissen W. E., Triyoso D., Younan P. y Lloyd R. E. (2004) Degradation of poly(A)-binding protein in apoptotic cells y linkage to translation regulation. *Apoptosis* 9, 67-75.
- Martineau Y., Derry M. C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J. J., Shyu A. B., Imataka H., Gehring K. y Sonenberg N. (2008) Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol Cell Biol* 28, 6658-6667.
- Martinez-Calvillo S., Nguyen D., Stuart K. y Myler P. J. (2004) Transcription initiation y termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3, 506-517.
- Martinez-Calvillo S., Yan S., Nguyen D., Fox M., Stuart K. y Myler P. J. (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11, 1291-1299.
- Masud M. M., Kuwahara M., Ozaki H. y Sawai H. (2004) Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX. *Bioorg Med Chem* 12, 1111-1120.
- Mathews D. H., Sabina J., Zuker M. y Turner D. H. (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288, 911-940.

- McNamara J. O., 2nd, Andrechek E. R., Wang Y., Viles K. D., Rempel R. E., Gilboa E., Sullenger B. A. y Giangrande P. H. (2006) Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat Biotechnol* 24, 1005-1015.
- Meddeb-Garnaoui A., Toumi A., Ghelis H., Mahjoub M., Louzir H. y Chenik M. (2010) Cellular y humoral responses induced by *Leishmania* histone H2B y its divergent y conserved parts in cutaneous y visceral leishmaniasis patients, respectively. *Vaccine* 28, 1881-1886.
- Melby P. C., Yang J., Zhao W., Perez L. E. y Cheng J. (2001) *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 4719-4725.
- Melo E. O., Dhalia R., Martins de Sa C., Standart N. y de Melo Neto O. P. (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) y efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem* 278, 46357-46368.
- Mendoza-Leon A., Luis L., Fernandes O., Cupolillo E. y Garcia L. (2002) Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1, S65-70.
- Miyakawa S., Oguro A., Ohtsu T., Imataka H., Sonenberg N. y Nakamura Y. (2006) RNA aptamers to mammalian initiation factor 4G inhibit cap-dependent translation by blocking the formation of initiation factor complexes. *Rna* 12, 1825-1834.
- Mochizuki K., Oguro A., Ohtsu T., Sonenberg N. y Nakamura Y. (2005) High affinity RNA for mammalian initiation factor 4E interferes with mRNA-cap binding y inhibits translation. *Rna* 11, 77-89.
- Moral L., Rubio E. M. y Moya M. (2002) A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96, 129-132.
- Moreno M., Rincon E., Pineiro D., Fernandez G., Domingo A., Jimenez-Ruiz A., Salinas M. y Gonzalez V. M. (2003) Selection of aptamers against KMP-11 using colloidal gold during the SELEX process. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 214-218.
- Morillas F., Sanchez Rabasco F., Ocana J., Martin-Sanchez J., Ocana-Wihelmi J., Acedo C. y Sanchiz-Marin M. C. (1996) Leishmaniosis in the focus of the Axarquia region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, y vector. *Parasitol Res* 82, 569-570.

- Muhich M. L. y Boothroyd J. C. (1988) Polycistronic transcripts in trypanosomes y their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 8, 3837-3846.
- Myler P. J., Audleman L., deVos T., Hixson G., Kiser P., Lemley C., Magness C., Rickel E., Sisk E., Sunkin S., Swartzell S., Westlake T., Bastien P., Fu G., Ivens A. y Stuart K. (1999) Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2902-2906.
- Nacher M., Carme B., Sainte Marie D., Couppie P., Clyti E., Guibert P. y Pradinaud R. (2001) Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course of pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol* 95, 331-336.
- Nebohacova M., Maslov D. A., Falick A. M. y Simpson L. (2004) The effect of RNA interference Down-regulation of RNA editing 3'-terminal uridylyl transferase (TUTase) 1 on mitochondrial de novo protein synthesis y stability of respiratory complexes in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* 279, 7819-7825.
- Nemeth A., Krause S., Blank D., Jenny A., Jenó P., Lustig A. y Wahle E. (1995) Isolation of genomic y cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res* 23, 4034-4041.
- Nietfeld W., Mentzel H. y Pieler T. (1990) The Xenopus laevis poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *Embo J* 9, 3699-3705.
- Niles J. C., Derisi J. L. y Marletta M. A. (2009) Inhibiting Plasmodium falciparum growth y heme detoxification pathway using heme-binding DNA aptamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13266-13271.
- Oguro A., Ohtsu T. y Nakamura Y. (2009) An aptamer-based biosensor for mammalian initiation factor eukaryotic initiation factor 4A. *Anal Biochem* 388, 102-107.
- Ohk S. H., Koo O. K., Sen T., Yamamoto C. M. y Bhunia A. K. (2010) Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of Listeria monocytogenes from food. *J Appl Microbiol*.
- Okochi K., Suzuki T., Inoue J., Matsuda S. y Yamamoto T. (2005) Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein y inducible poly(A)-binding protein: implication of Tob in translational control. *Genes Cells* 10, 151-163.
- Otero L. J., Ashe M. P. y Sachs A. B. (1999) The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent y cap-dependent translation by distinct mechanisms. *Embo J* 18, 3153-3163.

- Oughtred R., Bedard N., Adegoke O. A., Morales C. R., Trasler J., Rajapurohitam V. y Wing S. S. (2002) Characterization of rat100, a 300-kilodalton ubiquitin-protein ligase induced in germ cells of the rat testis y similar to the *Drosophila* hyperplastic discs gene. *Endocrinology* 143, 3740-3747.
- Padilla-Mejia N. E., Florencio-Martinez L. E., Figueroa-Angulo E. E., Manning-Cela R. G., Hernandez-Rivas R., Myler P. J. y Martinez-Calvillo S. (2009) Gene organization y sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. *BMC Genomics* 10, 232.
- Parsons M., Worthey E. A., Ward P. N. y Mottram J. C. (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6, 127.
- Patel G. P., Ma S. y Bag J. (2005) The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* 33, 7074-7089.
- Peacock C. S., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz J. C., Quail M. A., Peters N., Adlem E., Tivey A., Aslett M., Kerhornou A., Ivens A., Fraser A., Rajandream M. A., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z., Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S., Squares R., Whitehead S., Rabinowitsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S. L., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D. P., Oyola S. O., Hilley J. D., Brito L. O., Tosi L. R., Barrell B., Cruz A. K., Mottram J. C., Smith D. F. y Berriman M. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- Peitsch M. C., Wells T. N., Stampf D. R. y Sussman J. L. (1995) The Swiss-3DImage collection y PDB-Browser on the World-Wide Web. *Trends Biochem Sci* 20, 82-84.
- Pestova T. V., Borukhov S. I. y Hellen C. U. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 y 1A to locate initiation codons. *Nature* 394, 854-859.
- Pestova T. V., Lomakin I. B., Lee J. H., Choi S. K., Dever T. E. y Hellen C. U. (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332-335.
- Pestova, T. V., Lorsch, J. R. & Hellen, C. U. T. in *Translational Control in Biology y Medicine* (eds. Mathews, M. B., Sonenberg, N. & Hershey, J. W. B.) 87-128 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2007).
- Peters N. C. y Sacks D. L. (2009) The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol* 11, 1290-1296.
- Phillips J. A., Lopez-Colon D., Zhu Z., Xu Y. y Tan W. (2008) Applications of aptamers in cancer cell biology. *Anal Chim Acta* 621, 101-108.

- Pineda J. A., Martin-Sanchez J., Macias J. y Morillas F. (2002) Leishmania spp infection in injecting drug users. *Lancet* 360, 950-951.
- Piscopo T. V. y Mallia Azzopardi C. (2007) Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 83, 649-657.
- Preiss T. y M W. H. (2003) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25, 1201-1211.
- Probst P., Stromberg E., Ghalib H. W., Mozel M., Badaro R., Reed S. G. y Webb J. R. (2001) Identification y characterization of T cell-stimulating antigens from Leishmania by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol* 166, 498-505.
- Qiu H., Sun Y., Huang X. y Qu Y. (2010) A sensitive nanoporous gold-based electrochemical aptasensor for thrombin detection. *Colloids Surf B Biointerfaces* 79, 304-308.
- Rafati S., Salmanian A. H., Taheri T., Vafa M. y Fasel N. (2001) A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of Leishmania major. *Vaccine* 19, 3369-3375.
- Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., Sanos S., Kaye P., Taghikhani M., Jamshidi S. y Rad M. A. (2005) Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA y protein immunization with cysteine proteinases type I y II of L. infantum. *Vaccine* 23, 3716-3725.
- Ralser M., Nonhoff U., Albrecht M., Lengauer T., Wanker E. E., Lehrach H. y Krobitsch S. (2005) Ataxin-2 y huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. *Hum Mol Genet* 14, 2893-2909.
- Ramos E., Pineiro D., Soto M., Abanades D. R., Martin M. E., Salinas M. y Gonzalez V. M. (2007) A DNA aptamer population specifically detects Leishmania infantum H2A antigen. *Lab Invest* 87, 409-416.
- Rao J. N., Neumann L., Wenzel S., Schweimer K., Rosch P. y Wohrl B. M. (2006) Structural studies on the RNA-recognition motif of NELF E, a cellular negative transcription elongation factor involved in the regulation of HIV transcription. *Biochem J* 400, 449-456.
- Requena J. M., Alonso C. y Soto M. (2000) Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during Leishmania infections. *Parasitol Today* 16, 246-250.
- Rhie A., Kirby L., Sayer N., Wellesley R., Disterer P., Sylvester I., Gill A., Hope J., James W. y Tahiri-Alaoui A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein y inhibit conversion. *J Biol Chem* 278, 39697-39705.

- Rioux J. A., Lanotte G., Serres E., Pratlong F., Bastien P. y Perieres J. (1990) Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65, 111-125.
- Rivera C. I. y Lloyd R. E. (2008) Modulation of enteroviral proteinase cleavage of poly(A)-binding protein (PABP) by conformation y PABP-associated factors. *Virology* 375, 59-72.
- Robertson D. L. y Joyce G. F. (1990) Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* 344, 467-468.
- Routsias J. G., Kyriakidis N., Latreille M. y Tzioufas A. G. (2010) RNA recognition motif (RRM) of La/SSB: the bridge for interparticle spreading of autoimmune response to U1-RNP. *Mol Med* 16, 19-26.
- Rowlett R. M., Chrestensen C. A., Schroeder M. J., Harp M. G., Pelo J. W., Shabanowitz J., DeRose R., Hunt D. F., Sturgill T. W. y Worthington M. T. (2008) Inhibition of tristetraprolin deadenylation by poly(A) binding protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G421-430.
- Sachdeva R., Banerjea A. C., Malla N. y Dubey M. L. (2009) Immunogenicity y efficacy of single antigen Gp63, polytope y polytopeHSP70 DNA vaccines against visceral Leishmaniasis in experimental mouse model. *PLoS One* 4, e7880.
- Sachs A. B. y Kornberg R. D. (1985) Nuclear polyadenylate-binding protein. *Mol Cell Biol* 5, 1993-1996.
- Sachs A. B., Bond M. W. y Kornberg R. D. (1986) A single gene from yeast for both nuclear y cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure y expression. *Cell* 45, 827-835.
- Sachs A. B., Davis R. W. y Kornberg R. D. (1987) A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary y sufficient for RNA binding y cell viability. *Mol Cell Biol* 7, 3268-3276.
- Sacks D. y Noben-Trauth N. (2002) The immunology of susceptibility y resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.
- Sacks D. L. (1989) Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* 69, 100-103.
- Saitou N. y Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sastre N., Francino O., Ramirez O., Ensenat C., Sanchez A. y Altet L. (2008) Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Vet Parasitol* 158, 117-120.

- Sazani P. L., Larralde R. y Szostak J. W. (2004) A small aptamer with strong y specific recognition of the triphosphate of ATP. *J Am Chem Soc* 126, 8370-8371.
- Schuster G. y Grissem W. (1991) Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *Embo J* 10, 1493-1502.
- Searfoss A., Dever T. E. y Wickner R. (2001) Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), y Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* 21, 4900-4908.
- Sefah K., Tang Z. W., Shangguan D. H., Chen H., Lopez-Colon D., Li Y., Parekh P., Martin J., Meng L., Phillips J. A., Kim Y. M. y Tan W. H. (2009) Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* 23, 235-244.
- Sekiya S., Nishikawa F., Noda K., Kumar P. K., Yokoyama T. y Nishikawa S. (2005) In vitro selection of RNA aptamers against cellular y abnormal isoform of mouse prion protein. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 361-362.
- Shangguan D., Li Y., Tang Z., Cao Z. C., Chen H. W., Mallikaratchy P., Sefah K., Yang C. J. y Tan W. (2006) Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11838-11843.
- Sharma U. y Singh S. (2008) Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology y their control. *J Vector Borne Dis* 45, 255-272.
- Shaw G. y Kamen R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46, 659-667.
- Siddiqui N., Kozlov G., D'Orso I., Trempe J. F. y Gehring K. (2003) Solution structure of the C-terminal domain from poly(A)-binding protein in Trypanosoma cruzi: a vegetal PABC domain. *Protein Sci* 12, 1925-1933.
- Silva Junior F. P., Veyl F. Z., Clos J. y De Simone S. G. (2002) Molecular modeling approaches for determining gene function: application to a putative poly-A binding protein from Leishmania amazonensis (LaPABP). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 335-341.
- Sjolander A., Baldwin T. M., Curtis J. M., Bengtsson K. L. y Handman E. (1998) Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from Leishmania major induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine* 16, 2077-2084.
- Skabkina O. V., Skabkin M. A., Popova N. V., Lyabin D. N., Penalva L. O. y Ovchinnikov L. P. (2003) Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA. *J Biol Chem* 278, 18191-18198.

- Sladic R. T., Lagnado C. A., Bagley C. J. y Goodall G. J. (2004) Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 y 4. *Eur J Biochem* 271, 450-457.
- Smith D. F., Peacock C. S. y Cruz A. K. (2007) Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37, 1173-1186.
- Sobrino R., Ferroglio E., Oleaga A., Romano A., Millan J., Revilla M., Arnal M. C., Trisciuglio A. y Gortazar C. (2008) Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol* 155, 198-203.
- Sogin M. L., Gunderson J. H., Elwood H. J., Alonso R. A. y Peattie D. A. (1989) Phylogenetic meaning of the kingdom concept: an unusual ribosomal RNA from *Giardia lamblia*. *Science* 243, 75-77.
- Sonenberg N. y Dever T. E. (2003) Eukaryotic translation initiation factors y regulators. *Curr Opin Struct Biol* 13, 56-63.
- Sonenberg N. y Hinnebusch A. G. (2007) New modes of translational control in development, behavior, y disease. *Mol Cell* 28, 721-729.
- Soto J. y Toledo J. T. (2007) Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7, 7.
- Soto M., Alonso C. y Requena J. M. (2000) The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein LiP2a induces a prominent humoral response in vivo y stimulates cell proliferation in vitro y interferon-gamma (IFN-gamma) production by murine splenocytes. *Clin Exp Immunol* 122, 212-218.
- Stanlis K. K. y McIntosh J. R. (2003) Single-strand DNA aptamers as probes for protein localization in cells. *J Histochem Cytochem* 51, 797-808.
- Stern M. Z., Gupta S. K., Salmon-Divon M., Haham T., Barda O., Levi S., Wachtel C., Nilsen T. W. y Michaeli S. (2009) Multiple roles for polypyrimidine tract binding (PTB) proteins in trypanosome RNA metabolism. *Rna* 15, 648-665.
- Stoltenburg R., Reinemann C. y Strehlitz B. (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* 383, 83-91.
- Stuart K., Panigrahi A. K. y Schnauffer A. (2004) Identification y characterization of trypanosome RNA-editing complex components. *Methods Mol Biol* 265, 273-291.
- Sundar S. y Rai M. (2002) Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 15, 593-598.
- Sundar S., Pai K., Kumar R., Pathak-Tripathi K., Gam A. A., Ray M. y Kenney R. T. (2001) Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am J Trop Med Hyg* 65, 193-196.

- Swanson M. S., Nakagawa T. Y., LeVan K. y Dreyfuss G. (1987) Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence y domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, y pre-rRNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 7, 1731-1739.
- Tabar M. D., Altet L., Francino O., Sanchez A., Ferrer L. y Roura X. (2008) Vector-borne infections in cats: molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet Parasitol* 151, 332-336.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
- Tang Z., Parekh P., Turner P., Moyer R. W. y Tan W. (2009) Generating aptamers for recognition of virus-infected cells. *Clin Chem* 55, 813-822.
- Tang Z., Shangguan D., Wang K., Shi H., Sefah K., Mallikratchy P., Chen H. W., Li Y. y Tan W. (2007) Selection of aptamers for molecular recognition y characterization of cancer cells. *Anal Chem* 79, 4900-4907.
- Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular y biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523-533.
- Thakurta A. G., Ho Yoon J. y Dhar R. (2002) Schizosaccharomyces pombe spPABP, a homologue of Saccharomyces cerevisiae Pab1p, is a non-essential, shuttling protein that facilitates mRNA export. *Yeast* 19, 803-810.
- Thompson J. D., Gibson T. J. y Higgins D. G. (2002) Multiple sequence alignment using ClustalW y ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2, Unit 2 3.
- Toba G. y White K. (2008) The third RNA recognition motif of Drosophila ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res* 36, 1390-1399.
- Tuerk C. y Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Uchida N., Hoshino S., Imataka H., Sonenberg N. y Katada T. (2002) A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277, 50286-50292.
- Ullu E., Matthews K. R. y Tschudi C. (1993) Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. *Mol Cell Biol* 13, 720-725.
- Ulrich H., Magdesian M. H., Alves M. J. y Colli W. (2002) In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of Trypanosoma cruzi y inhibit cell invasion. *J Biol Chem* 277, 20756-20762.

- Valcarcel Y., Bastero R., Anegón M., González S. y Gil A. (2008) [The epidemiology of hospital admissions due to leishmaniasis in Spain (1999-2003)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26, 278-281.
- Vasudevan S., Garneau N., Tu Khounh D. y Peltz S. W. (2005) p38 mitogen-activated protein kinase/Hog1p regulates translation of the AU-rich-element-bearing MFA2 transcript. *Mol Cell Biol* 25, 9753-9763.
- Vermel M., Guermann B., Delage L., Grienemberger J. M., Marechal-Drouard L. y Gualberto J. M. (2002) A family of RRM-type RNA-binding proteins specific to plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5866-5871.
- Vickerman K. y Preston T. M. (1970) Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *J Cell Sci* 6, 365-383.
- Wakiyama M., Imataka H. and Sonenberg N. (2000) Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* 10, 1147-1150.
- Wang X. y Tanaka Hall T. M. (2001) Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol* 8, 141-145.
- Weissman J. S. (2001) The ins y outs of GroEL-mediated protein folding. *Mol Cell* 8, 730-732.
- Wiese M. (2007) Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context. *Int J Parasitol* 37, 1053-1062.
- Wilusz C. J., Gao M., Jones C. L., Wilusz J. y Peltz S. W. (2001) Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation y decapping in yeast cytoplasmic extracts. *Rna* 7, 1416-1424.
- Wincker P., Ravel C., Blaineau C., Pages M., Jauffret Y., Dedet J. P. y Bastien P. (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 24, 1688-1694.
- Winzen R., Kracht M., Ritter B., Wilhelm A., Chen C. Y., Shyu A. B., Müller M., Gaestel M., Resch K. y Holtmann H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 y an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* 18, 4969-4980.
- Woods A. J., Roberts M. S., Choudhary J., Barry S. T., Mazaki Y., Sabe H., Morley S. J., Critchley D. R. y Norman J. C. (2002) Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum y the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* 277, 6428-6437.

- Wu J. y Bag J. (1998) Negative control of the poly(A)-binding protein mRNA translation is mediated by the adenine-rich region of its 5'-untranslated region. *J Biol Chem* 273, 34535-34542.
- Xu D. y Liew F. Y. (1995) Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* 84, 173-176.
- Yang J. y Hunt A. G. (1992) Purification y Characterization of a 70-Kilodalton Polyadenylate-Binding Protein from Pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol* 98, 1115-1120.
- Yoffe Y., Zuberek J., Lewdorowicz M., Zeira Z., Keasar C., Orr-Dahan I., Jankowska-Anyszka M., Stepinski J., Darzynkiewicz E. y Shapira M. (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *Rna* 10, 1764-1775.
- Zhang B., Morace G., Gauss-Muller V. y Kusov Y. (2007) Poly(A) binding protein, C-terminally truncated by the hepatitis A virus proteinase 3C, inhibits viral translation. *Nucleic Acids Res* 35, 5975-5984.
- Zijlstra E. E. y el-Hassan A. M. (2001) Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95 Suppl 1, S27-58.
- Zuker M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding y hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.